

**Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-  
Maximilians-Universität München**

**Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. Thomas Ruzicka**

**Immunologische Veränderungen bei Patienten mit  
akneiformem Exanthem unter Cetuximab-Therapie**

**Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**Vorgelegt von  
Carolin Anna Maria Cyran  
aus  
München  
2010**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Professor Dr. med. Andreas Wollenberg

Mitberichterstatter Professor Dr. med. Chrisitan Schmoeckel  
Priv.-Doz. Dr. med. Simon Rothenfuß

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Julia Tietze

Dekan: Professor Dr. med. Dr. h. c. Maximilian  
Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>7</b>
2.1	Der EGF-Rezeptor und seine Liganden.....	7
2.2	Cetuximab .....	8
2.3	Das Cetuximab-assoziierte Exanthem.....	9
2.4	Fragestellung.....	13
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
3.1	Patienten und klinische Kriterien.....	16
3.1.1	Die Cetuximab Gruppe.....	16
3.1.2	Die Chemotherapie-Kontrollgruppe .....	17
3.1.3	Die gesunde Kontrollgruppe .....	17
3.1.4	Die RECIST-Kriterien .....	18
3.1.5	Der WoMo-Score.....	18
3.2	Material.....	19
3.2.1	Allgemein.....	19
3.2.3	Immunhistochemie.....	20
3.3	Durchflusszytometrie .....	21
3.3.1	Lymphozytenisolation aus Blut.....	21
3.3.2	Gewinnung einer epidermalen Einzelzellsuspension aus Spalthaut.....	22
3.3.3	Färbeprotokoll.....	22
3.3.4	Gating.....	22
3.4	Immunhistochemie .....	28
3.4.1	Biotin-Streptavidin-Methode .....	28
3.4.2	Paraffin-embedded tissue.....	28
3.4.3	Cryotec.....	28
3.4.4	Färbeprotokoll.....	29
3.5	Definition der Zellpopulationen .....	30
3.6	Statistik der Daten.....	32
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
4.1	Blut.....	33
4.1.1	Tabellarische Zusammenfassung.....	42
4.2	Haut.....	43
4.2.1	Epidermis .....	43
4.2.2	Dermis .....	48
4.2.3	Tabellarische Zusammenfassung.....	53
4.3	Exanthemgrad, immunbiologische Parameter und das Therapieansprechen: Zusammenhänge .....	55
4.4	Therapieansprechen.....	58
4.4.1	Therapieansprechen und Exanthem .....	58
4.4.2	Immunbiologische Parameter und das Therapieansprechen.....	59
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>61</b>
5.1	Das Cetuximab-assoziierte Exanthem .....	62
5.2	Veränderungen von Zellpopulationen im Blut.....	64

5.3	Expression antimikrobieller Peptide .....	65
5.4	Korrelation der Veränderungen von Zellpopulationen mit dem Exanthemgrad .....	66
5.5	Das Cetuximab-induzierte Exanthem und das Therapieansprechen .....	67
5.6	Immunbiologische Parameter und das Therapieansprechen .....	69
6	<b>Zusammenfassung</b> .....	70
7	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	73
8	<b>Anhang</b> .....	80
8.1	Statistisch nicht signifikant veränderte Zellpopulationen .....	80
8.1.1	Zellpopulationen im Blut .....	80
8.1.2	Zellpopulationen und antimikrobielle Peptide in der Haut .....	81
8.3	Reagenzien für die Durchflusszytometrie .....	82
8.2.1	Puffer .....	82
8.2.2	Antikörperverdünnung .....	83
8.3	Reagenzien für die Immunhistochemie .....	83
9	<b>Danksagung</b> .....	85
10	<b>Lebenslauf</b> .....	86

# 1 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-actinomycin D
APC	Allophycocyanin
B-RAF	V-raf Sarcom virales Oncogen Homolog B1
CD	Cluster of differentiation
CDR	Komplementärregionen (complementarity determining regions)
CUP	Carcinoma of unknown origin
DCs	Dendritische Zellen
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (epidermal growth factor receptor)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
HBD	Humanes $\beta$ -Defensin
HER	Humaner epithelialer Wachstumsfaktorrezeptor
HSV	Herpes simplex Virus
IDEC	Inflammatorische dendritische Zellen
Jak/STATs	Signalüberträger und Transkriptionsaktivatoren (signal transducers and activators of transcription)
Lin	Lineage Cocktail 1 (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)
min	Minuten
n.s.	Nicht signifikant
PE	Phycoerythrin
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
Rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)

Tregs	regulatorische T-Zellen
VH	„heavy chain“, schwere Kette eines Antikörpers
VL	„light chain“, leichte Kette eines Antikörpers

## **2 Einleitung**

### **2.1 Der EGF-Rezeptor und seine Liganden**

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR), auch bekannt als ErbB-1, ist ein 170 kD schweres transmembranäres Glykoprotein aus der ErbB (HER) Familie der Rezeptortyrosinkinasen [56], zu denen auch HER2/neu, HER3 und HER4 gehören [55]. Der EGF-Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne, einer einzelnen transmembranären Domäne und einer intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne mit einem regulatorischen Segment am Carboxyl-Ende [74]. EGFR (HER1) wird von dem Protoonkogen c-erb-B codiert [62].

Der EGF-Rezeptor wird in vielen normalen menschlichen Geweben exprimiert und in zahlreichen Karzinomen und Tumoren überexprimiert, so z.B. im kolorektalen Karzinom, Kopf- und Hals-Plattenepitheltumoren, Hirntumoren, Bronchial-Ca, Mamma-Ca, Nierenzell-Ca, Blasenkrebs, Prostata-Ca und Bronchial-Ca [27, 55]. Keratinozyten können in Kultur ab einer Koloniestärke von 10-15 Zellen die für ihre Vermehrung notwendige Stimulation des EGF-Rezeptors durch autokrine Stimulation durch EGF und TGF- $\alpha$  sicherstellen [53, 64]. Viele Zellen, die den EGF-Rezeptor überexprimieren, bilden zusätzlich endogene Liganden und können den EGFR Signalweg autokrin und parakrin aktivieren, was in vitro zu erhöhter Zellteilung und Zellüberleben führt [18, 30, 64, 71]. Unter Laborbedingungen können monoklonale Antikörper gegen EGFR die Vermehrung von Zellen hemmen, die sowohl EGFR als auch einen aktivierenden Liganden bilden [7, 45].

Die wichtigsten endogenen EGF-Rezeptor Liganden sind der epidermale Wachstumsfaktor, der transformierende Wachstumsfaktor-alpha (TGF- $\alpha$ ), Amphiregulin, Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor, Betacellulin und Epiregulin [5, 30]. Durch das Andocken des Liganden verändert sich die Konformation des Rezeptors, was zu Homo- oder Heterodimerisation mit weiteren EGF-Rezeptor-Molekülen oder zu Oligomerisation mit anderen Rezeptoren der ErbB Familie führt. Die Dimerisation leitet die Aktivierung von intrazellulären Tyrosin-Kinasen, der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K/Akt), der Proteinkinase C und der Jak/STATs (Signalüberträger und

Transkriptionsaktivatoren, signal transducers and activators of transcription) [55, 64, 74] ein. Die Autophosphorylierung und die Aktivierung des Signalwegs beeinflussen die zelluläre Transkription durch Protoonkogenprodukte wie c-Fos, c-Jun und c-myc, durch Zinkfinger Transkriptionsfaktoren wie Sp1 und Egr1 und andere [64]. Auf dem Niveau der Haut begünstigt die Aktivierung des Signalweges so das Fortschreiten des Zellzyklus, eine verminderte Fähigkeit zur Apoptose, Zellteilung von Keratinozyten und Fibroblasten und damit die Wundheilung, Angiogenese und Metastasierung [10].

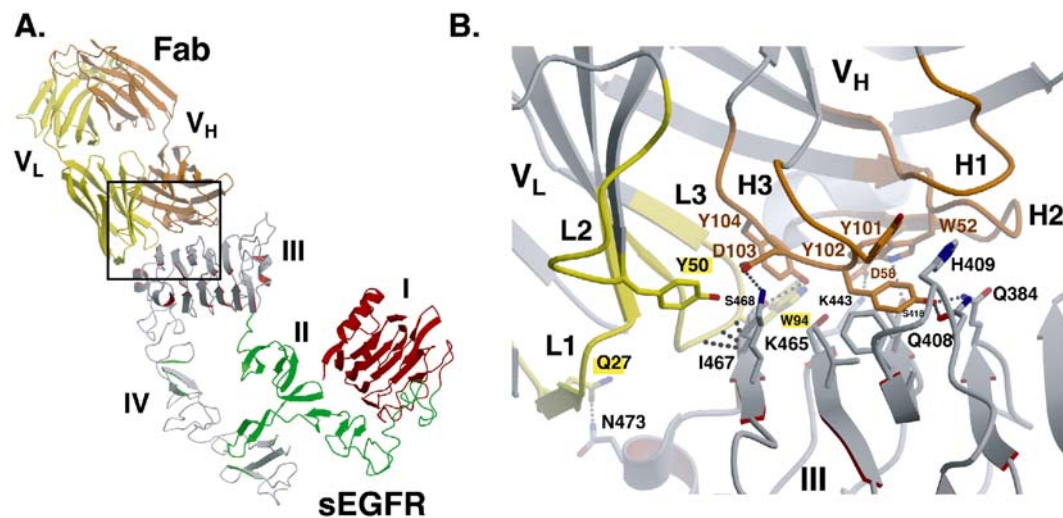
## **2.2 Cetuximab**

Der EGF-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle als Regulator von Zellüberleben, Zellteilung und Metastasierung, in der Onkogenese und der Tumorprogression. Seine Überexpression ist häufig mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien, fehlendem Ansprechen auf Chemotherapie, Hormontherapie und Radiotherapie und mit einer schlechten Prognose assoziiert [41, 64, 73, 80].

In der Krebstherapie ist es daher ein attraktiver Ansatz am EGFR anzugreifen [12]. Cetuximab ist ein rekombinanter, monoklonaler, chimärer, human-muriner Immunglobulin-G1-Antikörper, der an die extrazelluläre Domäne des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors bindet [25, 37]. Es verhindert so die Rezeptor-Autophosphorylierung und -Aktivierung [29] und bewirkt die Aufnahme des Rezeptors in die Zelle und seinen Abbau [21]: die kompetitive Rezeptorbindung unterbricht den EGFR Signalweg [6].

Cetuximab beeinflusst das Tumorwachstum auf mehrere Weisen: es verhindert das Fortschreiten des Zellzyklus [48] und aktiviert die Apoptose [81]. Es vermindert die Angiogenese durch verminderte VEGF-Expression [52, 74] und die Metastasierung durch verminderte Expression von Matrix-Metalloproteinasen [74]. Außerdem verbessert Cetuximab die Zytotoxizität der Chemotherapie [13] und der Radiotherapie [33] und kann die antikörper-abhängige zelluläre Abwehr aktivieren um den Tumor zu bekämpfen [74].





**Abbildung 1: Cetuximab gebunden an den EGF-Rezeptor**

A: Der EGFR-Inhibitor Cetuximab (Fab, VL-Kette in gelb, VH-Kette in orange dargestellt) bindet an die Domäne III der löslichen extrazellulären Region des inaktiven epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (sEGFR, Domäne I in rot, Domäne II in grün dargestellt; Domäne III und IV in grau mit jeweils roten oder grünen Kanten). Das Quadrat aus Abbildung A ist in Abbildung B vergrößert dargestellt. B: Detailansicht der Bindung zwischen Cetuximab und dem EGF-Rezeptor. Die bindungsrelevanten Regionen „complementarity determining regions“ (CDRs) der VL-Kette sind gelb und die der VH-Kette orange, der Rest des Cetuximab-Moleküls ist grau dargestellt. Relevante Seitenketten sind dargestellt. Die chemischen Label der Aminosäuren in der VH-Kette des Cetuximab-Moleküls sind orange dargestellt, in der VL-Kette schwarz auf gelbem Grund; die Label der Aminosäuren des löslichen EGF-Rezeptors sind schwarz auf weiß angegeben. Wasserstoffbrückenbindungen sind mit einer gestrichelten grauen Linie dargestellt. Abbildung und Bildunterschrift entnommen aus [43].

Zusammengefasst führt Cetuximab zur Akkumulation der Zellen in der G1 Phase durch fehlende Aktivierung der Zyklin-abhängigen Kinasen [14, 74]: Die Syntheseaktivität nimmt ab und die CDK2-, CDK4-, und CDK6-assoziierten Histon-H1 Kinasen vermindern ihre Aktivität, während die Zellzyklusinhibitoren p27(KIP1) und p15(INK4B) vermehrt exprimiert werden [39, 74]. Der Zellzyklusstop in der G1 Phase führt zur Apoptose [74].

### **2.3 Das Cetuximab-assoziierte Exanthem**

Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper, der zunehmend in der Krebstherapie eingesetzt wird. Unter Cetuximab-Therapie treten unterschiedliche Nebenwirkungen auf. Die häufigsten sind Schwächegefühl, Fieber, Übelkeit und Hauterscheinungen, vor allem ein akneiformes, makulo-papulöses Exanthem [16, 24, 62]. Diese

Nebenwirkungen finden sich häufig auch bei anderen EGF-Rezeptor Inhibitoren und Tyrosin-Kinase Inhibitoren, wie Erlotinib, Iressa und Panitumumab. Hautveränderungen unter monoklonalen Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor sind ausgeprägter als die unter den Tyrosin-Kinase Inhibitoren [35].

Das akneiforme Hautexanthem tritt in der Regel bei etwa 85% (77% - 100%) der behandelten Patienten auf, in den meisten Fällen (89%) innerhalb der ersten drei Wochen nach Behandlungsbeginn [10, 16, 24, 46, 62]. Es betrifft meist Gesicht [58], Brust, Nacken, den oberen Rücken [11], Kopfhaut [11], die Haut hinter den Ohren, und seltener Arme und Beine [2]. In Abbildung 2 sind Beispiele für die typischen Hautveränderungen unter Cetuximab-Therapie dargestellt.

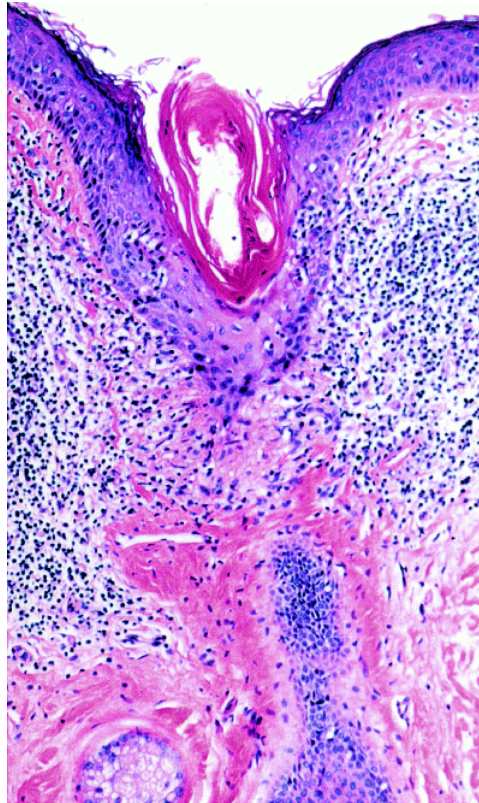


**Abbildung 2: Beispiel eines Patienten mit Cetuximab-induziertem Exanthem**

*Im Gesicht finden sich multiple Papeln, Papulopusteln und Pusteln sowie ausgeprägte gelbliche Krusten v. a. an beiden Nasenflügeln. Am oberen Rücken zeigen sich multiple, teils konfluierende, dicht stehende erythematöse Papeln, Papulopusteln und Pusteln in symmetrischer Anordnung [78]*

Histopathologisch zeigt sich um das Haarinfundibulum ein Infiltrat aus T-Zellen und neutrophilen Granulozyten. Der Haarfollikel wird zerstört und es bilden sich sterile Pusteln [28]. Zum einen besteht ein mittelschweres Infiltrat von Entzündungszellen in der oberen Dermis, welches hyperkeratotische und ektatische Haarinfundibula umgibt. Zum anderen tritt eine neutrophile, sterile, eitrige Follikulitis auf, die das Epithel durchbricht [15, 35]. Besonders zu beachten ist, dass es zu keinen

Veränderungen an den dermalen Kapillaren, den ekkrinen Drüsen oder Talgdrüsen kommt [3, 72], wie sie typischerweise bei der klassischen Akne zu beobachten sind. In Abbildung 3 ist ein Beispiel für das histologische Bild des entzündlichen Hautinfiltrats unter Cetuximab-Therapie dargestellt.



**Abbildung 3: Histologisches Bild des entzündlichen Infiltrats beim Cetuximab-induzierten Exanthem**

*Oberflächliches dermales Lymphozyteninfiltrat, das ein hyperkeratotisches follikuläres Infundibulum umgibt. (Hämatoxylin und Eosin Färbung, Original Vergrößerung x200) [11].*

Mikrobiologische Färbungen und Kulturen konnten keine infektiöse Ursache belegen [11, 35]. Diese Befunde weisen darauf hin, dass es sich bei der eitrigen Entzündung entweder um eine Reaktion auf die Zerstörung des Haarfollikels oder um eine Immunreaktion auf Cetuximab oder einen direkten Effekt der EGF-Rezeptor-Inhibition auf die Keratinisation des normalen Follikels handeln könnte [2]. Diese mikrobiologischen Befunde beweisen zudem, dass es sich bei dem akneiformen Exanthem nicht um Akne vulgaris handelt, da diese durch Talgdrüsenhypertrophie,

Komedonen und Entzündung als Antwort auf *Propionibacterium acnes* gekennzeichnet ist [1].

Die Pathogenese des makulo-papulösen Hautexanthems ist nicht geklärt und sein Auftreten ist bisher unvorhersehbar. Das akneiforme Exanthem wird von manchen Arbeitsgruppen als ein klinischer prognostischer Marker für das Therapieansprechen betrachtet, da das Auftreten des Hautexanthems in vielen Studien signifikant mit Therapieansprechen und Überleben korreliert [6, 10, 16, 50, 51, 62, 67]. Andere Studien bestätigen diese Korrelation nicht [8, 15, 38, 63].

Cunningham et al. [16] beschreiben, dass Patienten, die Hautveränderungen entwickeln, häufiger auf die Cetuximab-Therapie ansprechen als diejenigen ohne Hautveränderungen. Nach Saltz et al. [61] sprechen Patienten mit einem Exanthem von wenigstens Schweregrad 2 statistisch signifikant besser auf die Therapie an und das Auftreten des Hautexanthems korreliert positiv mit längerem Überleben [62].

Entgegen theoretischer Erwartungen korreliert das Ansprechen auf die Cetuximab-Therapie nicht mit der EGF-Rezeptor-Expression im Tumor [16, 74]. Klinisches Ansprechen kommt selbst bei immunhistochemisch nicht nachweisbarer EGF-Rezeptor Expression vor [74]. Somatische Mutationen in der Tyrosin-Kinase Domäne des EGF-Rezeptors korrelieren mit dem Ansprechen auf Tyrosin-Kinase Inhibitoren [30, 74], aber nicht auf Cetuximab [74].

Roskos et al. [59] haben in pharmakokinetischen Studien für Panitumumab, einem anderen EGFR-Inhibitor, gezeigt, dass hier das Exanthem dem Sättigungsausmaß der Rezeptor-Clearance entspricht. Es kann damit als indirekter Marker der effektiven Rezeptorsättigung und Rezeptorblockade oder als Indikator der optimalen biologischen Dosis dienen. Trotzdem entwickeln nicht alle Patienten Hautveränderungen, nicht einmal unter der maximal tolerierten Dosis, bei der davon ausgegangen werden kann, dass die EGF-Rezeptoren wirksam blockiert werden. Saltz et al. [62] und Soulières et al.[67] haben vorgeschlagen, dass Unterschiede in der Hauttoxizität auf pharmakokinetische oder pharmakodynamische Unterschiede oder auf pharmakogenetische Heterogenität und Polymorphismen des EGF-Rezeptors zurückzuführen sein könnten. Die Reaktion könnte auch ein Indikator dafür sein, inwieweit ein Patient in der Lage ist, eine immunvermittelte Entzündungsreaktion auf das Medikament zu entwickeln. Damit wäre das Exanthem ein Surrogatmarker für die Immunkompetenz und nicht für die Rezeptorinhibition [50].

Pastore et al. [47] stellen dar, wie die Blockade des EGF-Rezeptors das Gleichgewicht der Zytokinexpression in epidermalen Keratinozyten verschiebt. Am Beispiel der – T-Zell vermittelten - Kontaktdermatitis konnten sie zeigen, dass die EGF-Rezeptor Inhibition die Hautentzündung verstärkt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Schweregradklassifikation der akneiformen Hautveränderungen nach dem WoMo-Score vorgenommen [77]. In den WoMo-Score gehen der Flächenbefall von Körper und Gesicht ein, sowie der Schweregrad der Hautveränderungen. Bei der Beurteilung des Exanthems werden Erythem-Intensität, Erythem-Verteilung, Papelbildung, Pustelbildung und Schuppen/Krusten bewertet. Andere Arbeiten klassifizieren die Hautveränderungen nach dem Schema des National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events [32], dieses erlaubt jedoch keine Quantifizierung zur vergleichenden Beurteilung im Zeitverlauf.

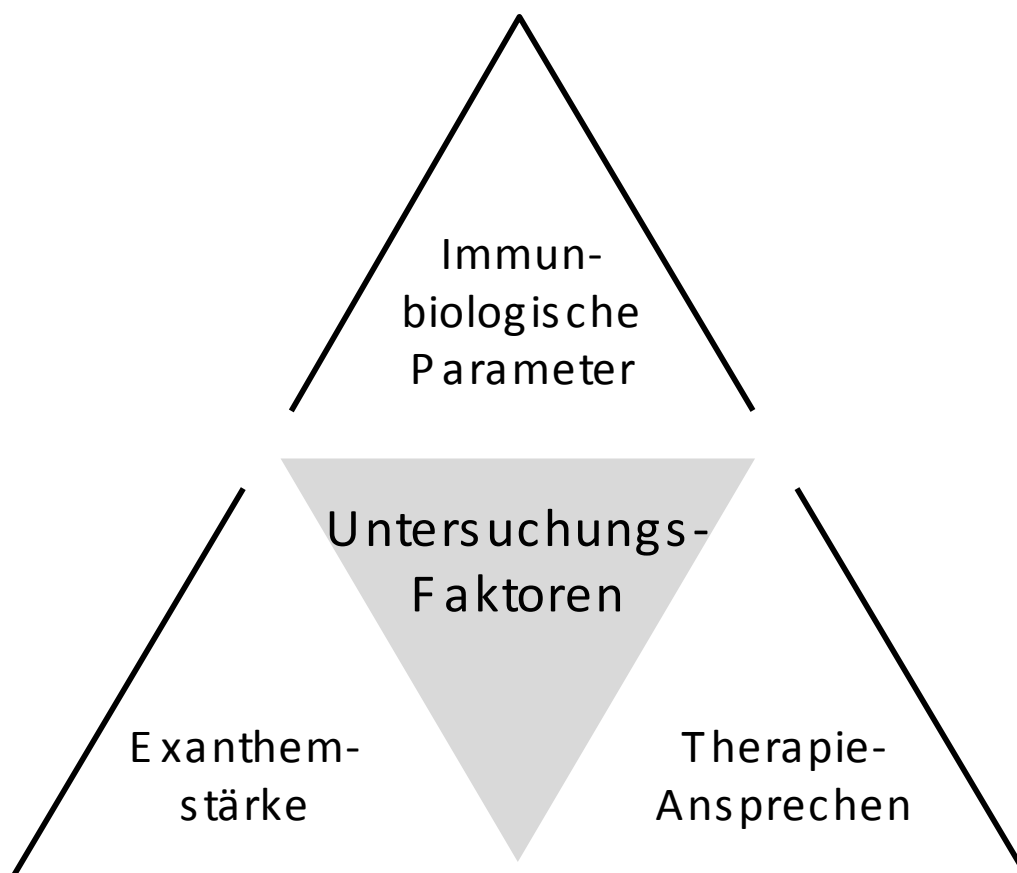
## **2.4 Fragestellung**

Das Auftreten eines makulo-papulo-pustulösen Exanthems korrelierte in der Mehrzahl der klinischen Studien mit einem Ansprechen des behandelten Tumors, sowie dem Überleben und der Prognose des Patienten. Allerdings spricht nur ein begrenzter Anteil der Patienten, die mit Cetuximab behandelt werden, auf die Therapie mit dem EGFR-Inhibitoren an. Aufgrund der Nebenwirkungen und der nicht unerheblichen Kosten der Therapie, ist es von Interesse im Vorfeld die Patienten einzugrenzen, die von der Therapie profitieren. Das Exanthem tritt erst nach einigen Tagen bis Wochen nach Behandlungsbeginn auf und ist somit als prädiktiver Marker für ein Tumoransprechen nicht sinnvoll verwertbar. Ein Biomarker für die Auswahl der Patienten, die von einer Cetuximab-Therapie profitieren, war zu Beginn dieser Untersuchungen nicht etabliert.

Da es sich beim Cetuximab-induzierten Exanthem nicht um ein primär infektiöses, sondern um ein immunologisches Geschehen handeln dürfte, lag es nahe, nach patientenspezifischen immunologischen Markern zu suchen, die bereits vor Therapiebeginn bestimmbar sind und Aufschluss über die wahrscheinliche

Wirksamkeit von Cetuximab geben könnten. Ein solcher prädiktiver Marker könnte über eine Vorauswahl der Patienten eine effektivere und effizientere Therapie ermöglichen.

Zudem sollten über eine Analyse des entzündlichen Infiltrats, der in der Läsion nachweisbaren antigen-präsentierenden dendritischen Zellen und der antimikrobiellen Peptide Rückschlüsse auf die Genese des Cetuximab-induzierten Exanthems gewonnen werden.



**Abbildung 4: Faktoren der Untersuchung und ihre Zusammenhänge**

*Im Rahmen der Untersuchung wurden Zellpopulationen im Blut und in der Haut und antimikrobielle Peptide in der Haut durchflusszytometrisch und immunhistochemisch bestimmt und mit der durch den WoMo-Score quantifizierten Exanthemstärke und dem nach den RECIST-Kriterien klassifizierten Therapie-Ansprechen in Beziehung gesetzt.*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Subpopulationen von Lymphozyten und dendritischen Zellen in Blut und Haut, sowie antimikrobielle Peptide in der Haut der

Patienten untersucht und mit gesunden Kontrollpersonen und Patienten unter einer Standard-Chemotherapie verglichen. Diese immunbiologischen Parameter wurden mit klinischen Daten zur Ausprägung des Exanthems, die als WoMo-Score quantifiziert wurde, und dem Therapieansprechen, das nach den RECIST-Kriterien klassifiziert wurde, in Korrelation gesetzt (siehe Abbildung 4).

Konkret sollten folgende Fragen untersucht werden:

- Wie setzt sich das akneiforme Exanthem zusammen?
- Sind bestimmte Subpopulationen von Lymphozyten oder dendritischen Zellen im Rahmen einer Cetuximab-Therapie in Blut oder Haut vermindert oder vermehrt nachweisbar?
- Ist die Expression antimikrobieller Peptide in der Haut im akneiformen Exanthem verändert?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen den untersuchten Zellpopulationen oder antimikrobiellen Peptiden und der Ausprägung des Cetuximab-assoziierten Exanthems?
- Korrelieren die nachgewiesenen Veränderungen auch mit dem Überleben der Patienten?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Patienten und klinische Kriterien**

In diese Studie wurden insgesamt 78 Personen in drei Gruppen eingeschlossen. 54 Patienten in die Cetuximab-Gruppe, 12 Patienten in eine Chemotherapie-Gruppe und 12 gesunde Probanden.

##### **3.1.1 *Die Cetuximab Gruppe***

Das Patientengut für die dieser Doktorarbeit zugrunde liegende Studie rekrutierte sich aus Patienten, die von ihren Onkologen zur Behandlung der unter Cetuximab auftretenden Hautveränderungen an die Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München überwiesen wurden. Es handelte sich dabei um Patienten aus der Medizinischen Klinik III im Klinikum Großhadern, Patienten aus dem Klinikum Rechts der Isar der TU München und von niedergelassenen Onkologen aus dem Raum München.

Die 54 Teilnehmer der Studie waren zu 75,9% männlich (41 von 54) und zu 24,1% weiblich (13 von 54) und zwischen 35 und 88 Jahre, im Durchschnitt 61,0 Jahre alt. 68,5% (37 von 54) der Patienten litten an einem kolorektalen Karzinom, 14,8 (8 von 54) der Patienten an einem Plattenepithelkarzinom des Kopfes oder Halses, 5,6% (3 von 54) an einem Pankreas-Karzinom, 3,7% (2 von 54) an einem CUP-Syndrom und je 1,9% (1 von 54) an einem HCC, Magenkarzinom, Mammakarzinom oder Cervix-Karzinom.

In der Cetuximab-Gruppe erhielten 27,8% der Patienten Cetuximab als Monotherapie (15 von 54), 3,7 % (2 von 54) erhielten zusätzlich Radiotherapie. 68,6% der Patienten in der Cetuximab-Gruppe (37 von 54) erhielten Cetuximab in Kombination mit einem oder mehreren Chemotherapeutika: 35,2% (19 von 54) erhielten Irinotecan, 13,0% (7 von 54) erhielten Oxaliplatin + 5-FU, 11,1% (6 von 54) erhielten Irinotecan + 5-FU, 5,6% (3 von 54) erhielten Irinotecan + Capecitabin, 1,9% (1 von 54) erhielten Oxaliplatin, 1,9% (1 von 54) erhielten Cisplatin + Gemcitabin.



Im Rahmen der Erstvorstellung wurden die Patienten über die Studie informiert und um ihre Teilnahme am klinischen und am experimentellen Teil gebeten. Im Falle des Einverständnisses auch zum experimentellen Teil und dessen schriftlicher Dokumentation wurden dann im Einvernehmen mit der Ethikkommission von den behandelnden Dermatologen 20 ml Blut und bei 26 Patienten zwei 4mm Stanzbiopsien und bei 8 Patienten ca. 0,5 cm<sup>2</sup> Spalthaut aus den betroffenen Hautarealen entnommen. Die Blutprobe wurde bei der Abnahme heparinisiert und die Proben bis zur weiteren Aufarbeitung am selben Tag im Kühlschrank aufbewahrt.

### **3.1.2 Die Chemotherapie-Kontrollgruppe**

Die Patienten der Chemotherapie-Kontrollgruppe wurden von Dermatologen auf den onkologischen Stationen des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität aufgesucht und um ihre Teilnahme an der Studie gebeten. Sie waren zu 75% männlich (9 von 12) und zu 25% weiblich (3 von 12) und waren zwischen 43 und 78 Jahren, im Durchschnitt 62,75 Jahre alt. 41,6% (5 von 12) litten an einem Kolorektalen Karzinom, 8,3% (1 von 12) an einem Adeno-Karzinom des Ösophagus, 8,3% (1 von 12) an einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, 8,3% (1 von 12) an einem CUP und von 25% (3 von 12) liegen keine Informationen vor. Die Patienten der Chemotherapie-Kontrollgruppe erhielten zu 75% (9 von 12) Oxaliplatin + 5-FU, zu 25% (3 von 12) Irinotecan + 5-FU.

### **3.1.3 Die gesunde Kontrollgruppe**

Die Kontrollgruppe 12 gesunder Vergleichspersonen für die Untersuchungen im Blut rekrutierte sich aus dem Umfeld der Autorin sowie aus dem Personal der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Probanden waren zu 33,3% männlich und zu 66,7% weiblich und zwischen 18 und 38 Jahren, im Durchschnitt 27 Jahre alt und litten unter keinen bekannten Vorerkrankungen. Die 8 Hautproben für die Vergleichsuntersuchungen der Spalthaut waren Teil von Spalthautentnahmen für plastische Deckungen, während die 5 Proben von normaler Haut für die Immunhistochemie aus den Beständen des Labors für Histologie der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München entstammten.

### **3.1.4 Die RECIST-Kriterien**

Die mit Cetuximab behandelten Patienten wurden bezüglich ihres Therapieansprechens von ihrem behandelnden Onkologen nach den RECIST-Kriterien aus dem Jahre 2000 („response evaluation criteria in solid tumors“) klassifiziert. Diese Kriterien legen die Gesichtspunkte fest, nach welchen zu beurteilen ist, ob es bei Patienten unter einer bestimmten Therapie zu einem Stillstand des Tumorwachstums („stable disease“), einer Reduktion des Tumorumfanges („partial remission“) oder sogar zu einem kompletten Verschwinden des Tumors („complete remission“) oder aber zu einem Fortschreiten der Tumorerkrankung („progressive disease“) gekommen ist [69].

„Complete remission“ bedeutet ein komplettes Verschwinden des Primärtumors und kein Nachweis von Metastasen.

„Partial remission“ bedeutet eine Reduktion des längsten Durchmessers des Primärtumors von wenigstens 30% verbunden mit einem Nichtfortschreiten der Metastasierung.

„Stable disease“ bedeutet einen unveränderten oder um weniger als 30% reduzierten Primärtumor bei unveränderter Metastasierung.

„Progressive disease“ bedeutet Wachstum des Primärtumors, der Metasen oder das Auftreten neuer Metastasen.

Diese Daten wurden in der Folge mit den immunbiologischen Parametern und dem Exanthem in Form des WoMo-Score korreliert.

### **3.1.5 Der WoMo-Score**

Um die Hautveränderungen der Patienten im Zeitverlauf beurteilen, quantifizieren und dokumentieren zu können, wurde der WoMo-Score verwendet [77]. Dieser berechnet sich wie folgt:

- A= Körper-Beteiligung  
(Prozentualer Flächenbefall der Hautveränderungen am Körper, 0-100%)
- B = Gesichtsbeteiligung  
(Prozentualer Flächenbefall der Hautveränderungen im Gesicht, 0-100%)
- C = Score der Hautveränderungen  
(5 Werte, je von 0 bis 3)
- Erythem-Intensität ( keines - hellrot – moderat – dunkelrot)
- Erythem-Verteilung (keines – vereinzelt – mittel – dicht)
- Papelbildung (gewichteter Wert für Anzahl, Größe und Verfärbung)
- Pustelbildung (gewichteter Wert für Anzahl, Größe und Verfärbung)
- Schuppen/Krusten (gewichteter Wert für Anzahl, Größe und Verfärbung)

Berechnung des endgültigen Score =  $\frac{1}{4} A + \frac{1}{4} B + \frac{10}{3} C$

Der WoMo-Score kann grundsätzlich Werte zwischen 0 und 100 annehmen, Werte über 60 sind jedoch selten. Der WoMo-Score diene dazu, den Exanthemgrad des Patienten zu quantifizieren. Dieser Grad wurde bei jedem Termin des Patienten analysiert und aktualisiert [74]. Die Patienten wurden alle zwei bis vier Wochen klinisch untersucht und stellten sich dafür zwischen einem bis zehn Mal beim Dermatologen vor.

Als WoMax wurde der höchste im Zeitverlauf ermittelte WoMo-Wert definiert, der meist, aber nicht immer, mit dem WoMo-Score der Erstuntersuchung identisch war.

## 3.2 Material

### 3.2.1 Allgemein

1,5 ml safe-lock Eppendorf caps	<i>Eppendorf</i>
Ep T.I.P.S. Standard (0,5 -20µl)	<i>Eppendorf</i>
Ep T.I.P.S. standard (2-200µl)	<i>Eppendorf</i>
Heparin-Natrium 25.000 I.E./ml Injektionslösung	<i>Braun</i>
RMPI 1640 Medium	<i>Biochrom AG</i>
Lymphoprep	<i>Axis Shield PoCAS</i>
Antibiotikum/Antimykotikum Lösung	<i>Invitrogen</i>
Trypsin	<i>SigmaAldrich</i>

DNAse

*SigmaAldrich*

### **3.2.2 Durchflusszytometrie**

CompBeads

*Beckton Dickinson*

Facs-Flow

*Beckton Dickinson*

Facs-Lysing solution

*Beckton Dickinson*

Facs-Permeabilizing solution

*Beckton Dickinson*

Facs-Tubes 0,6ml

*Greiner bio-one*

FITC labelled anti-human CD3

*Beckton Dickinson*

FITC labelled mouse IgG<sub>1</sub>  $\kappa$  Isotype control

*Beckton Dickinson*

7AAD

*Calbiochem*

PE labelled anti-human IL4

*Pharmingen*

PE labelled anti-human CD123

*Beckton Dickinson*

Coulter Clone T6-RD1 clone SFC119Thy1A8 (CD 1a)

*Beckman Coulter*

PE-Cy7 labelled CD4

*Beckton Dickinson*

PE-Cy7 labelled HLA-DR

*Beckton Dickinson*

PE-Cy7 labelled mouse IgG<sub>1</sub> Isotype control

*Beckton Dickinson*

APC labelled anti-human CD11c

*Beckton Dickinson*

APC labelled mouse IgG<sub>1</sub> Isotype control

*Beckton Dickinson*

Alexa Fluor 647 labelled mouse anti-human CD56

*Beckton Dickinson*

Alexa Fluor 647 labelled mouse IgG<sub>1</sub> Isotype control

*Beckton Dickinson*

APC-Cy7 labelled mouse anti-CD8

*Beckton Dickinson*

APC-Cy7 labelled mouse IgG<sub>1</sub> Isotype control

*Beckton Dickinson*

### **3.2.3 Immunhistochemie**

Tissue-Tek O.C.T. Compound

*Sakura Finetechnical Co.*

Cryomold Biopsy Specimen Molds 10mm x 10mm x 5mm

*Sakura Finetechnical Co.*

2-Methylbutan

*CARL ROTH GMBH + CO KG*

Objektträger für Techmat 500 75 $\mu$ m grau

*DakoCytomation*

Objektträgerkästen

*neolab*

EZ-DeWax Tissue Deparaffinization Solution

*Biogenex*

Protease

*Sigma*

ChemMate Antibody Diluent

*DakoCytomation*

Immunokit 2000

*DakoCytomation*

Rabbit serum

*Sigma*

Mouse IgG<sub>1</sub>  $\kappa$

*Beckton Dickinson*

CD3

*Novocastra Laboratories Ltd.*

CD4 (AB8)

*Neomarkers, Fremont, CA*

CD8 clone C8/144B)

*DakoCytomation*

CD25

*Novo Castra Laboratories*

CD45R0

*Zymed, San Francisco, CA*

CD45RA	<i>abcam</i>
CD56	<i>Novo Castra Laboratories</i>
CD68 (KP1)	<i>Dako</i>
CD206 (MR)	<i>freundlicherw. zu Forschungszwecken zu Verfügung gestellt von Lanzavecchia, Basel, Schweiz</i>
CD207 (Langerin)	<i>IBL, UK</i>
BDCA-2 (CD303)	<i>MACS Mitenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach</i>
$\beta$ -Defensin 1 (Human) Antiserum für Immunhistochemie (rabbit)	<i>Phoenix Pharmaceuticals</i>
$\beta$ -Defensin 2 (Human) Antiserum für Immunhistochemie (rabbit)	<i>Phoenix Pharmaceuticals</i>
Anti-human $\beta$ -Defensin 3 monoclonal antibody (mouse)	<i>Immundiagnostik AG</i>
Cathelicidin LL37 antibody (3D11) (mouse)	<i>abcam</i>

### **3.3 Durchflusszytometrie**

#### **3.3.1 *Lymphozytenisolation aus Blut***

Das heparinisierte Blut wurde steril in einem 50 ml Falcon-Röhrchen 1:1 mit Ly-Waschmedium verdünnt und dann in zwei weiteren 50 ml Falcon-Röhrchen je zur Hälfte im Verhältnis 2:1 auf Lymphoprep/Ficoll aufgeschichtet, dabei sollten sich die zwei Phasen nicht mischen. Anschließend wurden die Röhrchen bei 2400 rpm ruckfrei und ohne Bremse 20 min lang mit 100 s Hochfahrzeit zentrifugiert. Die Interphase wurde mit einer 5 ml Pipette abgezogen und zweimal in einem mit Ly-Waschmedium gefüllten 50ml Falcon-Röhrchen bei 1000 rpm mit Bremse 5 min gewaschen.

Das Pellet wurde in 10 ml Ly-Waschmedium oder Kulturmedium resuspendiert, 8,8  $\mu$ l der Suspension entnommen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurden 16 Quadrate ausgezählt und die Anzahl der Zellen dann mit 10 000 multipliziert um auf die Zellzahl in Millionen pro Milliliter zu kommen.

Dann wurde die Lösung bei 1000 rpm 5 min lang zentrifugiert und in einer Konzentration von ca. 1 Million Zellen pro Well auf einer 96 Well-Platte verteilt und nochmals zentrifugiert.

### **3.3.2 Gewinnung einer epidermalen Einzelzellsuspension aus Spalthaut**

Die Spalthaut-Biopsie wurde nach der Abnahme in eine feuchte Kompresse gewickelt und gekühlt transportiert. Unter dem Abzug wurde sie mit sterilem PBS in einer kleinen Petrischale mechanisch gereinigt und dann auf einer neuen Platte in winzige Streifen geschnitten, mit ca. 300 µl 0,5% Trypsin bedeckt und über Nacht bei 4°C (alternativ 90-120 min bei 37°) inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Streifen in 2 ml RPMI-Lösung suspendiert und mit Hilfe vorne abgeschnittener Eppendorf-Pipettenspitzen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. 200 µl boviner DNase (Sigma Deisenhofen 0,1%) wurde hinzugefügt, das Falcon-Tube kurz vorsichtig mit Hilfe des Rüttlers geschüttelt und für 3 min im Brutschrank bei 37° inkubiert. Anschließend wurde die Mischung 1 min lang vorsichtig mit Hilfe des Rüttlers geschüttelt und mit vorne abgeschnittenen blauen Eppendorf-Pipettenspitzen der Überstand durch ein 50 µm Nylonnetz in ein neues 15 ml Falcon-Tube pipettiert. Es wurden weitere 3 ml RPMI in das erste Falcon-Röhrchen gegeben, neuerlich mit Hilfe des Rüttlers geschüttelt und in das zweite Röhrchen pipettiert. Die Suspension wurde mit RPMI auf 10 ml aufgefüllt, die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und das Röhrchen 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in FACS-Puffer resuspendiert und auf eine 96-well-Platte übertragen.

### **3.3.3 Färbeprotokoll**

Die Verdünnung der Antikörper ist im Anhang aufgeführt. Die Zellen auf der 96 well Platte wurden einmal mit Facs-Puffer gewaschen. Die extrazellulären Antikörper wurden in ihrer jeweiligen Verdünnung in 50µl Facs-Puffer gelöst und die Zellen darin resuspendiert. Nach 15-20 min auf Eis oder im Kühlschrank wurde mit 100µl Facs-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 50 µl Facs-Puffer resuspendiert und mit dem Durchflusszytometer eingemessen.

### **3.3.4 Gating**

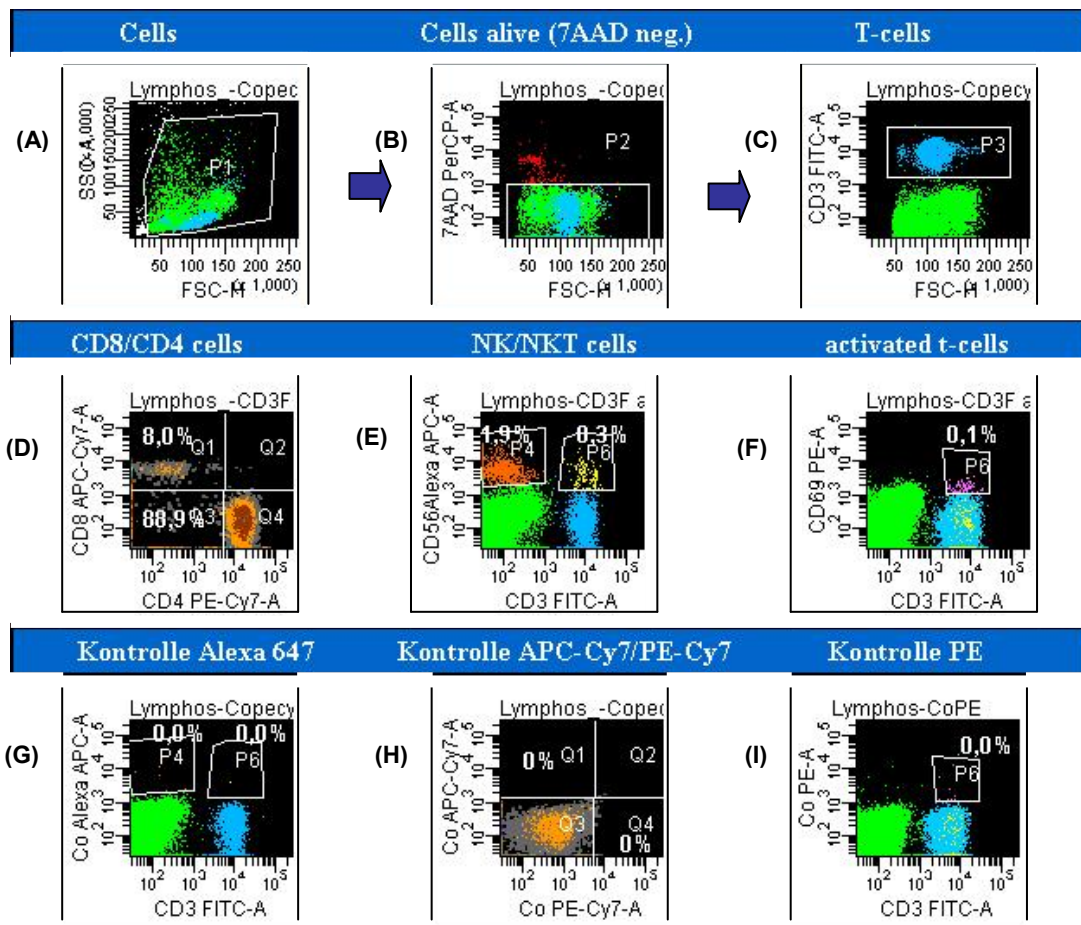
Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Oberflächenproteinanalyse von Zellen in Einzelzellsuspension. In den hier vorliegenden Untersuchungen wurden Rezeptoren von T-Zellen und dendritischen Zellen mit Hilfe eines 6-Farben FACSCanto I analysiert. Dieser verfügt über einen blauen Laser mit einer Anregungswellenlänge

von 488 nm und einen roten Laser mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm. Bei der Auswertung der gewonnenen Daten kam die FACSDiva Software zum Einsatz. Die Auswahl der Zellen („gating“) geschah nach dem Verteilungsmuster in den Dotplots. Die Dotplots zeigen die Fluoreszenz-Intensität in log10 Stufen auf einer vier Zehnerstufen umfassenden Skala.

In Abbildung 5 ist das Gating der Lymphozytenpopulationen dargestellt. Nach Auswahl der registrierten Elemente von Einzelzellgröße (A) wurden aus diesen die 7AAD- lebenden Zellen ausgewählt (B). Aus dieser Population wurde durch CD3-Färbung die T-Zellen ausgewählt (C) und in CD3C+CD4+ T-Helferzellen und CD3+CD8+ zytotoxische T-Zellen unterteilt (D).

Zusätzlich wurden aus den 7AAD- lebenden Zellen die Populationen der CD3-CD56+ NK-Zellen und der CD3+CD56+ NKT-Zellen (E) und der CD3+CD69+ aktivierten T-Zellen (F) bestimmt.

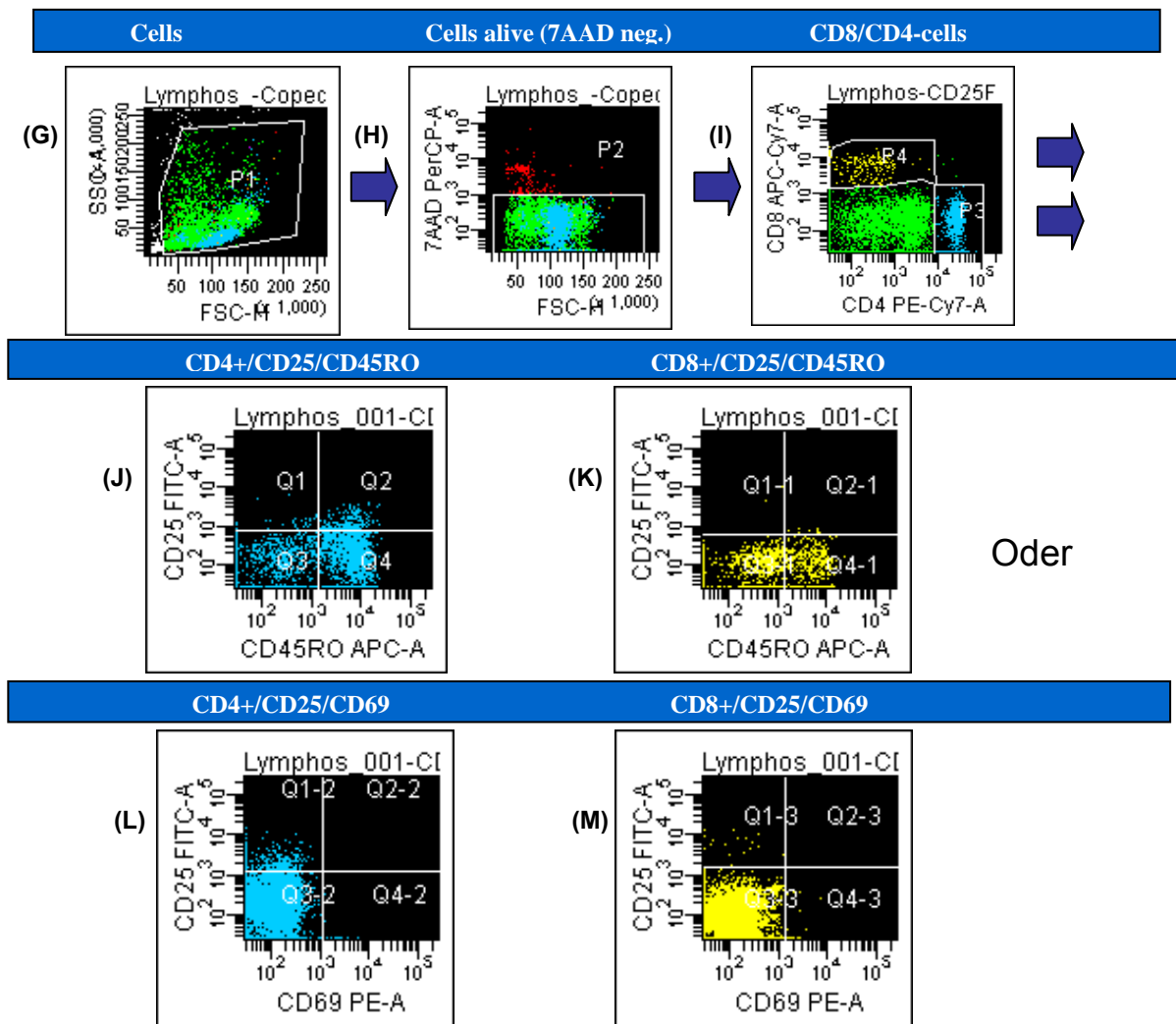
Die bei allen Zellbestimmungen durchgeführten Kontrollfärbungen mit Maus-IgG1 Farbstoffen (F, G, H) dienten der genauen Auswahl der spezifisch gefärbten Zellen. Jedes Gate für eine spezifische Färbung wurde mit der Kontrolle verglichen um unspezifisch gefärbte Elemente auszuschließen.



**Abbildung 5: Darstellung des Gatings der Lymphozytenpopulationen**

In Dotplot (A) werden die Events von Einzelzellgröße ausgewählt, in Dotplot (B) werden aus diesen die lebenden 7AAD- Zellen ausgewählt. In Dotplot (C) wiederum werden aus den lebenden Zellen die CD3+T-Zellen ausgewählt und in Dotplot (D) in CD3+CD4+ T-Helferzellen und CD3+CD8+ zytotoxische T-Zellen unterteilt. In Dotplot (E) werden die 7AAD- lebenden Zellen unterteilt in CD3-CD56+ NK-Zellen und CD3CD56+ NKT-Zellen, in Dotplot (F) werden aus den 7AAD- lebenden Zellen die CD3+CD69+ aktivierten T-Zellen ausgewählt. Alle Gates wurden mit den entsprechenden Kontrollfärbungen verglichen um ein sauberes Gating zu gewährleisten.





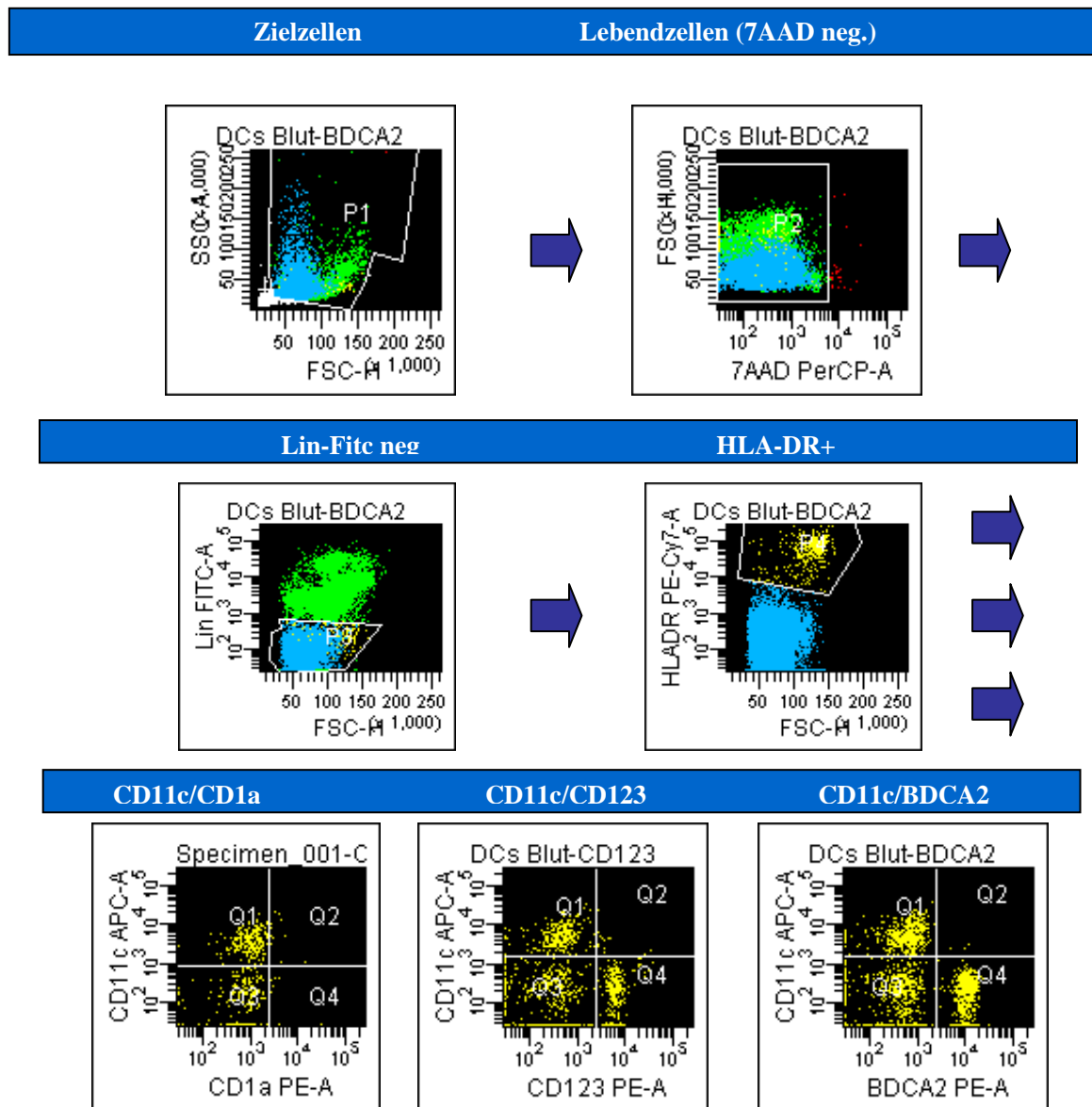
**Abbildung 6: Darstellung des Gatings der antigenerfahrenen T-Zellen und der regulatorischen und nicht-regulatorischen T-Zellen.**

In Dotplot (G) wurden die Events von Einzelzellgröße ausgewählt und in Dotplot (H) auf die 7AAD-lebenden Zellen eingegrenzt. In Dotplot (I) wurden im Gate P3 die CD3+CD4+ T-Helferzellen und im Gate P4 die CD3+CD8+ zytotoxischen T-Zellen ausgewählt. In Dotplot (J) wurden die CD4+ T-Helferzellen in CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen und in CD4+CD45RO Memory T-Helferzellen unterteilt, und in Dotplot (K) die CD8+CD25+ regulatorischen zytotoxischen T-Zellen und die CD8+CD45RO+ Memory zytotoxischen T-Zellen definiert. Im Dotplot (L) wurden die CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen, die CD4+CD69+ aktivierten T-Helferzellen und die CD4+CD25+CD69+ aktivierten regulatorischen T-Zellen dargestellt. Ebenso wurden in Dotplot (M) die CD8+CD25+ regulatorischen zytotoxischen T-Zellen, die CD8+CD69+ aktivierten zytotoxischen T-Zellen und die CD8+CD25+CD69+ aktivierten zytotoxischen regulatorischen T-Zellen bestimmt.

In Abbildung 6 ist das Gating der regulatorischen T-Zellen, der antigenerfahrenen und der aktivierten Lymphozyten dargestellt. Auch in diesem Fall wurden in den Dotplots (G) und (H) die Elemente von Einzelzellgröße und die 7AAD- lebenden Zellen ausgewählt und in Dotplot (I) in CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxische T-Zellen unterteilt. Die CD4+ T-Helferzellen wurden anschließend in den Dotplots (J) und (L) in CD4+25+ regulatorische T-Zellen, in CD4+CD45R0+ Memory T-Helferzellen, in CD4+CD25+CD45R0+ Memory regulatorische T-Zellen und in CD4+CD69+ aktivierte T-Helferzellen und CD4+CD25+CD69+ aktivierte regulatorische T-Zellen unterteilt. Ebenso wurden die CD8+ zytotoxischen T-Zellen in den Dotplots (K) und (M) in CD8+CD45R0+ Memory zytotoxische T-Zellen, in CD8+CD25+CD45R0+ Memory T-Zellen und in CD8+CD69+ aktivierte zytotoxische T-Zellen und CD8+CD25+CD69+ aktivierte nicht-regulatorische Memory T-Zellen unterteilt.

In Abbildung 7 ist das Gating der dendritischen Zellen dargestellt, so wie es bei der Färbung der dendritischen Zellen sowohl aus Blut als auch aus Spalthaut durchgeführt wurde. Zuerst wurden in Dotplot (A) die Elemente von Einzelzellgröße und aus diesen in Dotplot (B) die 7AAD- lebenden Zellen ausgewählt. In Dotplot (C) wurden die Lineage- Zellen ausgewählt und in Dotplot (D) aus diesen die HLADR+Lin- dendritischen Zellen bestimmt. Die dendritischen Zellen wurden dann in Dotplot (E) näher in CD11c-CD1a+ Langerhans-Zellen und CD11c+CD1a+ inflammatorischen dendritischen Zellen unterteilt. In Dotplot (F) wurden die CD11c+CD123- myeloiden dendritischen Zellen und die CD11c-CD123+ plasmazytoiden dendritischen Zellen bestimmt und die Werte mit den in Dotplot (G) bestimmten CD11c+BDCA2- myeloiden Zellen und CD11c-BDCA2+ plasmazytoiden dendritische Zellen verglichen.

Plasmazytoide dendritische Zellen sind eine seltene HLADR exprimierende Zellpopulation, die jedoch keine weiteren Lineage-Marker aufweist. Zur Gating Strategie sind zwei positive Identifikationsmechanismen beschrieben, die zur internen Qualitätskontrolle unabhängig voneinander bestimmt und dargestellt wurden. Bei diesen handelte es sich um CD11c-CD123+ Zellen, die den CD11c-BDCA2+ Zellen entsprechen sollten.



**Abbildung 7: Darstellung des Gatings der Dendritischen Zellen**

In Dotplot (A) wurden die Elemente von Einzelzellgröße ausgewählt und in Dotplot (B) die 7AAD-lebenden Zellen ausgewählt. In Dotplot (C) wurden die Lineage- Zellen ausgewählt und in Dotplot (D) daraus die HLA-DR+Lin- dendritischen Zellen und aus diesen in Dotplot (E) die CD11c-CD1a+ Langerhans-Zellen und die CD11c+CD1a+ inflammatorischen dendritischen Zellen bestimmt. In Dotplot (F) wurden die CD11c-CD123+ plasmazytoiden dendritischen Zellen und die CD11c+CD123-myeloiden dendritischen Zellen bestimmt und mit den in Dotplot (G) bestimmten Werten der CD11c-BDCA2+ plasmazytoiden dendritischen Zellen und der CD11c+BDCA2- myeloiden dendritischen Zellen verglichen.

### **3.4 Immunhistochemie**

#### **3.4.1 *Biotin-Streptavidin-Methode***

Die Immunhistochemie erlaubt die Darstellung von Zellrezeptoren in situ am Paraffin- oder Kryo-konservierten Schnitt. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde das DakoKit 5005 von Dako Hamburg verwendet. Das Prinzip besteht darin das Antigen auf den Zellen mit einem spezifischen Antikörper, dem Primärantikörper, zu markieren und daran einen Sekundärantikörper, den so genannten Link-Antikörper, zu koppeln. Dieser ist gegen das Fc/Fab-Fragment des Primärantikörpers gerichtet und biotinyliert. Zwischen dem Vitamin Biotin und dem Eiweißglykoprotein Avidin besteht eine hohe Affinität und die Methode erhält dadurch eine hohe Empfindlichkeit. In einem weiteren Schritt erfolgt die Inkubation mit Streptavidin, an welches alkalische Phosphatase gebunden ist. Dem Substrat der nun folgenden Chromogenlösung ist zur Unterdrückung der gewebeeigenen alkalischen Phosphatase ein Tropfen Levamisole beigemischt. Durch die Reaktion der alkalischen Phosphatase mit dem Chromogengemisch wird der Antigen-Antikörper-Komplex in der Lichtmikroskopie sichtbar gemacht.

#### **3.4.2 *Paraffin-embedded tissue***

Die Gewebestanden, die für die Paraffinschnitte bestimmt sind, wurden im Standardmedium der Dermatologischen Klinik in die Histologie geliefert und dort in Formalin fixiert und in Paraffinblöcke eingebettet.

An Paraffinschnitten ist generell die histologische Darstellung besser erhalten als an Gefrierschnitten, dafür werden manche Antigene durch die Formalinfixierung teils dauerhaft denaturiert oder müssen durch antigen-retrieval (Vorbehandlung) wieder zugänglich gemacht werden.

#### **3.4.3 *Cryotec***

Die nativen Hautstanzen wurden in feuchte Gaze gewickelt und bis zur weiteren Aufbereitung am selben Tag im Kühlschrank gelagert. Ein Cryomold-Förmchen wurde blasenfrei mit Tissue-Tek gefüllt und die Hautprobe darin versenkt. Dabei war es wichtig die Epidermis immer gleich auszurichten um mit dem Schneiden von der Seite beginnen zu können. Anschließend wurde die Masse in mit flüssigem Stickstoff

gekühltem 2-Methylbutan versenkt bis sie weiß und opak wurde und bis zum Schneiden bei -80°C tiefgefroren.

#### **3.4.4 Färbeprotokoll**

Die Verdünnung der Antikörper ist im Anhang aufgeführt. Die Paraffinschnitte wurden stehend in einem Objektträgerbehälter je 5 min lang in Dewax I und in Dewax II wechselgebadet, wobei es wichtig war, sie beim Wechseln gut abtropfen zu lassen und dann fünf- bis sechsmal in Leitungswasser gut zu spülen. Anschließend wurden die Schnitte, so es der Antikörper erforderte, vorbehandelt.

Für die Protease-Vorbehandlung wurden 5 mg Protease in 10 ml Tris-Puffer gelöst und nach ca. 10 min für 10 min auf die Schnitte gegeben. Die alkalische Vorbehandlung wurde mit EDTA pH 8,0 durchgeführt und die Schnitte 10 min gekocht. Für die saure Vorbehandlung wurden die Schnitte in Citrat pH 6,0 10 min lang gekocht oder bei pH 3,0 30 min lang gekocht.

Es war wichtig beim Kochen kein zu kleines Gefäß einzusetzen und dieses gut zu verschließen, damit die Flüssigkeit nicht verdampfte und die Schnitte trocken lagen. Es empfahl sich, entweder im Dampfdruckkochtopf zu kochen oder in der Mikrowelle den Deckel des Gefäßes mit Klebeband abzudichten. Bei beiden Methoden sollte die Flüssigkeit erst zum Kochen gebracht werden und anschließend bei geringerer Energiezufuhr köcheln. Manche Antikörper benötigten ein längeres Vorkochen.

Manche Antikörper ließen sich nur auf Kryo-Schnitten anwenden. Gefrorene Schnitte sollten in der feuchten Kammer einige Minuten auftauen und anschließend 10 min lang in Aceton fixiert werden. Anschließend wurden sie wie Paraffinschnitte behandelt.

Das Gewebe wurde 10 min mit Milch inkubiert, mit seitlichen Blicken ließ sich kontrollieren, dass die Schnitte gut bedeckt waren. In dieser Zeit wurden die Objektträger mit einem wasserfesten Stift beschriftet. Die Milch wurde mit Saugpapier rund herum abgewischt, von den Schnitten selbst aber nicht entfernt, diese durften nicht berührt werden. 75 µl Antikörper-Lösung wurden auf das Gewebe gegeben und 45 min lang inkubiert. Nach dieser Zeit wurde mit Tris-Puffer fünf Mal gespült, indem der Puffer über die schräg gehaltenen Objektträger lief, welche anschließend wieder trocken getupft wurden. Das Gewebe wurde dann mit je 75 µl Link-AK-Lösung aus dem DakoKit 5 min inkubiert, die Objektträger wieder fünf Mal mit Tris-Puffer abgespült und trocken gewischt. Zu diesem Zeitpunkt wurde die

Heizplatte unter der Glyceringelatine auf 50 -100°C erhitzt. Die Schnitte wurden mit 75 µl Streptavidin aus dem DakoKit 5min lang inkubiert. In dieser Zeit wurde die Chromogenlösung vorbereitet, für jeden Objektträger 75 µl Substrat und je 3 µl von den Chromogenen C, D und E, welche in dieser Reihenfolge zugegeben werden mussten. Die Lösung durfte höchstens 10 min stehen, da sonst Kristalle beginnen auszufallen. Anschließend wurden die Objektträger wieder fünf Mal gespült und trocken gewischt, ohne dass die Schnitte berührt werden durften. Das Gewebe wurde mit je 75 µl Chromogenlösung 10 min inkubiert, die Zeit musste bei einer starken Reaktion eventuell abgekürzt werden. Nach zweimaligem Spülen mit Tris-Puffer wurden ein bis zwei Tropfen Hämalaun für 30 sec auf das Gewebe gegeben und die Objektträger anschließend noch 5 min in Leitungswasser zum Bläuen gegeben. Die Objektträger wurden noch einmal rund um die Schnitte sauber gewischt und mit Glasdeckeln und warmer Glyceringelatine eingedeckelt.

### 3.5 Definition der Zellpopulationen

Die Zellpopulationen, die im Rahmen dieser Untersuchungen durchflusszytometrisch und immunhistochemisch analysiert wurden, wurden anhand typischer Oberflächenmerkmale definiert.

In Tabelle 1 ist eine Zusammenfassung der im Blut untersuchten Lymphozytenpopulationen und ihrer definierenden Oberflächenantigene dargestellt.

Zellpopulation	Antigene
T-Zellen	CD3+
T-Helferzellen	CD3+CD4+
zytotoxische T-Zellen	CD3+CD8+
aktivierte T-Zellen	CD3+CD69+
aktivierte T-Helferzellen	CD3+CD4+CD69+
aktivierte zytotoxische T-Zellen	CD3+CD8+CD69+
regulatorische T-Zellen	CD3+CD4+CD25+
regulatorische zytotoxische T-Zellen	CD3+CD8+CD25+
aktivierte regulatorische T-Zellen	CD3+CD4+CD25+CD69+
aktivierte regulatorische zytotoxische T-Zellen	CD3+CD8+CD25+CD69+
Memory T-Helferzellen	CD3+CD4+CD45R0+
zytotoxische Memory Zellen	CD3+CD8+CD45R0+
NK-Zellen	CD56+CD3-
NK-T-Zellen	CD56+CD3+

**Tabelle 1: Untersuchte Lymphozytenpopulationen und ihre definierenden Oberflächenantigene**

*In dieser Tabelle sind die durchflusszytometrisch im Blut untersuchten Lymphozytenpopulationen zusammen mit den Antigenen, mittels derer sie identifiziert wurden, dargestellt.*

In Tabelle 2 sind die im Blut und in der Spalthaut durchflusszytometrisch untersuchten Populationen dendritischer Zellen mit ihren Oberflächenantigenen zusammengefasst.

Zellpopulation	Antigene
Dendritische Zellen	HLADR+Lin-
Langerhanszellen	CD11c-CD1a+
Inflammatorische Dendritische Zellen (IDEC)	CD11c+CD1a+
Plasmazytoide Dendritische Zellen	CD11c-CD123+
Plasmazytoide Dendritische Zellen	CD11c-BDCA2+
Myeloide Dendritische Zellen	CD11c+CD123-
Myeloide Dendritische Zellen	CD11c+BDCA2-

**Tabelle 2: Untersuchte Populationen dendritischer Zellen und ihre Oberflächenantigene**

*In dieser Tabelle sind die durchflusszytometrisch im Blut und in der Spalthaut untersuchten Populationen dendritischer Zellen zusammen mit den Antigenen dargestellt, mittels derer sie identifiziert wurden.*

In Tabelle 3 sind die immunhistochemisch in der Haut untersuchten Zellpopulationen, die sowohl Lymphozyten, als auch Monozyten und dendritische Zellen beinhalten, zusammen mit ihren Oberflächenantigenen aufgeführt.

Zellpopulation	Antigene
T-Zellen	CD3+
T-Helferzellen	CD4+
zytotoxische T-Zellen	CD8+
regulatorische T-Zellen	CD25
Memory T-Zellen	CD45R0
naive T-Zellen	CD45RA
NK-Zellen	CD56
Monozyten/Makrophagen	CD68 (KP1)
Inflammatorische Dendritische Zellen (IDEC)	CD206 (MR)
Langerhanszellen	CD207 (Langerin)
Plasmazytoide Dendritische Zellen	BDCA-2 (CD303)

**Tabelle 3: Oberflächenantigene immunhistochemisch analysierter Lymphozytenpopulationen, Monozyten und Populationen dendritischer Zellen**

*In dieser Tabelle sind die immunhistochemisch untersuchten Lymphozytenpopulationen, Monozyten und Populationen dendritischer Zellen zusammen mit den Antigenen dargestellt, mittels derer sie identifiziert wurden.*

### **3.6 Statistik der Daten**

Nach dem Import in das SPSS Programm wurde zunächst die Gruppenzugehörigkeit numerisch verschlüsselt. Dann wurde eine explorative Datenanalyse durchgeführt. Diese erlaubte die Erhebung der deskriptiven statistischen Verteilung nach Probandengruppen und ihrer Darstellung in Histogrammen und Boxplots. Hiermit ließ sich klären, ob eine Gauß'sche Normalverteilung vorlag.

Da die vorliegenden Daten nicht normalverteilt waren, wurde für jede der einzelnen Zell-Subpopulationen ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen nicht-parametrischen Test, mit dem mehr als zwei unabhängige Stichproben untereinander verglichen werden können. Mit diesem Test wurde errechnet, ob zwischen zweien der drei Gruppen ein signifikanter Unterschied bestand, unbesehen zwischen welchen der drei. Hierbei wurde  $p \leq 0,05$  als signifikant,  $p \leq 0,01$  als hochsignifikant bezeichnet.

Bestand im Kruskal-Wallis-Test zwischen den Gruppen eine Signifikanz von  $p \leq 0,05$  wurde je ein Mann-Whitney-U Test durchgeführt um die Chemotherapie-Kontrollgruppe und die gesunde Kontrollgruppe mit der Cetuximab-Gruppe zu vergleichen. Hierbei handelt es sich um einen nicht-parametrischen Test, mit dem zwei unabhängige Stichproben miteinander verglichen werden können. Außerdem wurden die einzelnen Zell-Subpopulationen mit dem WoMo-Score und dem WoMoMax korreliert. Hier wurde die bivariate Korrelation nach Spearman eingesetzt. Im Falle einer Signifikanz der Korrelation von  $p \leq 0,05$  wurde ein Streudiagramm mit einer Regressionsgerade erstellt. Im Diagramm ließ sich die Steigung der Regressionsgerade leicht ablesen und damit der positive oder negative Zusammenhang visuell darstellen.

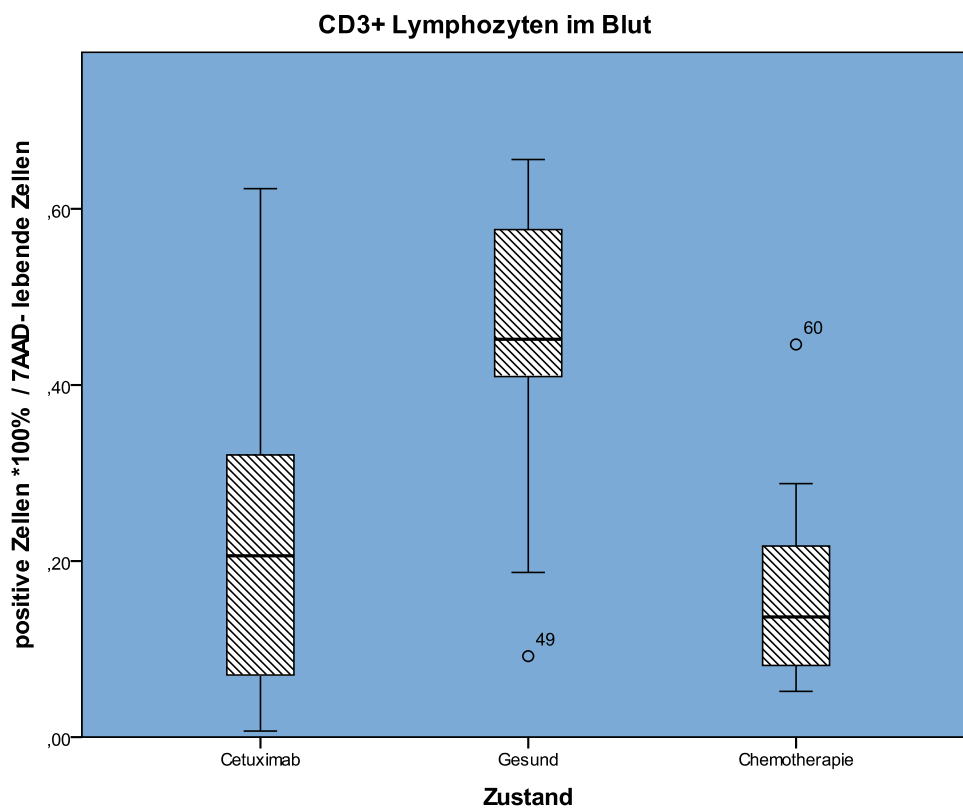
In den Grafiken ist die Verteilung der Daten dargestellt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Blut

Wie in Abbildung 8 dargestellt, finden sich im Blut der mit Cetuximab behandelten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen, jedoch nicht zu Patienten unter Cetuximab-freier Chemotherapie, signifikant weniger CD3+ T-Zellen. Diese werden als prozentualer Anteil an den 7AAD- lebenden Zellen angegeben.

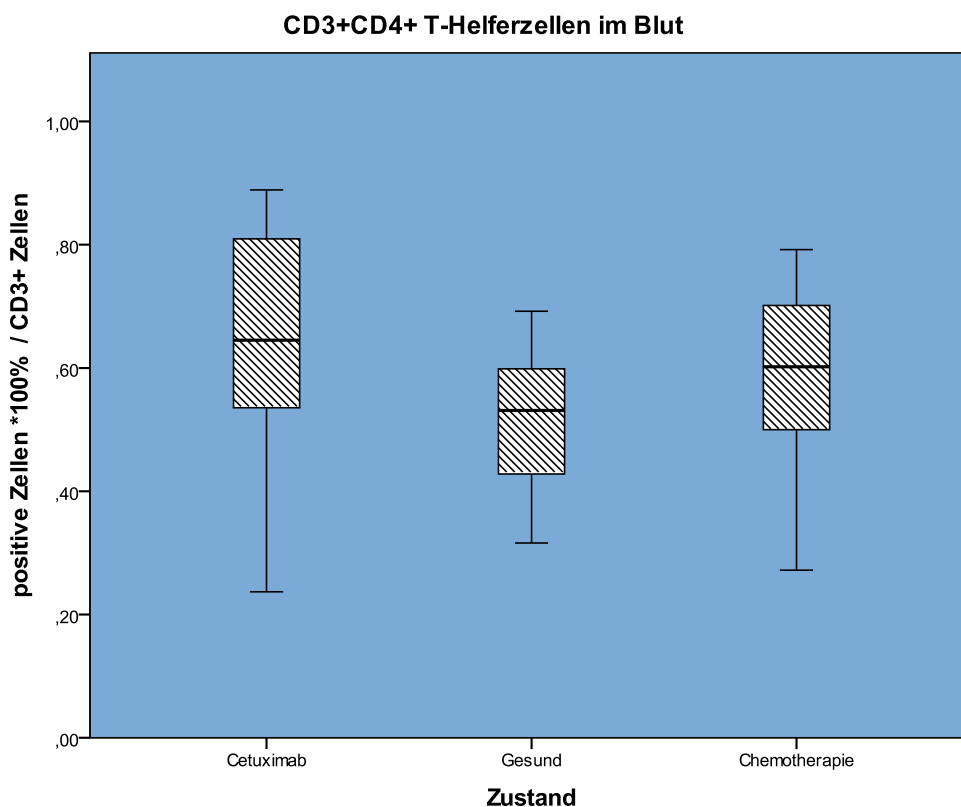


**Abbildung 8: CD3+ T-Zellen sind bei Cetuximab-behandelten Patienten vermindert**

*Durchflusszytometrische Analyse der CD3+ T-Zellen aus Blut als Prozentsatz der 7AAD- lebenden Zellen. Diese sind bei mit Cetuximab behandelten Patienten gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe signifikant vermindert ( $p < 0,01$ ). Ein ähnlicher Effekt zeigt sich bei der Chemotherapie-Kontrollgruppe im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe. CD3+ T-Zellen sind also bei mit Chemotherapie behandelten Patienten mit oder ohne Cetuximab vermindert.*

Bei der mit Cetuximab behandelten Gruppe sind es  $20,6\% \pm 14,8\%$  CD3+ T-Zellen und bei der gesunden Kontrollgruppe  $44,4\% \pm 17,9\%$  ( $p < 0,01$ ). Bei der Chemotherapie-Kontrollgruppe finden sich mit  $16,4\% \pm 11,5\%$  noch weniger CD3+ T-Zellen als bei mit Cetuximab-behandelten Patienten. Bei mit Chemotherapie mit oder ohne Cetuximab behandelten Patienten finden sich damit vermindert CD3+ T-Zellen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe.

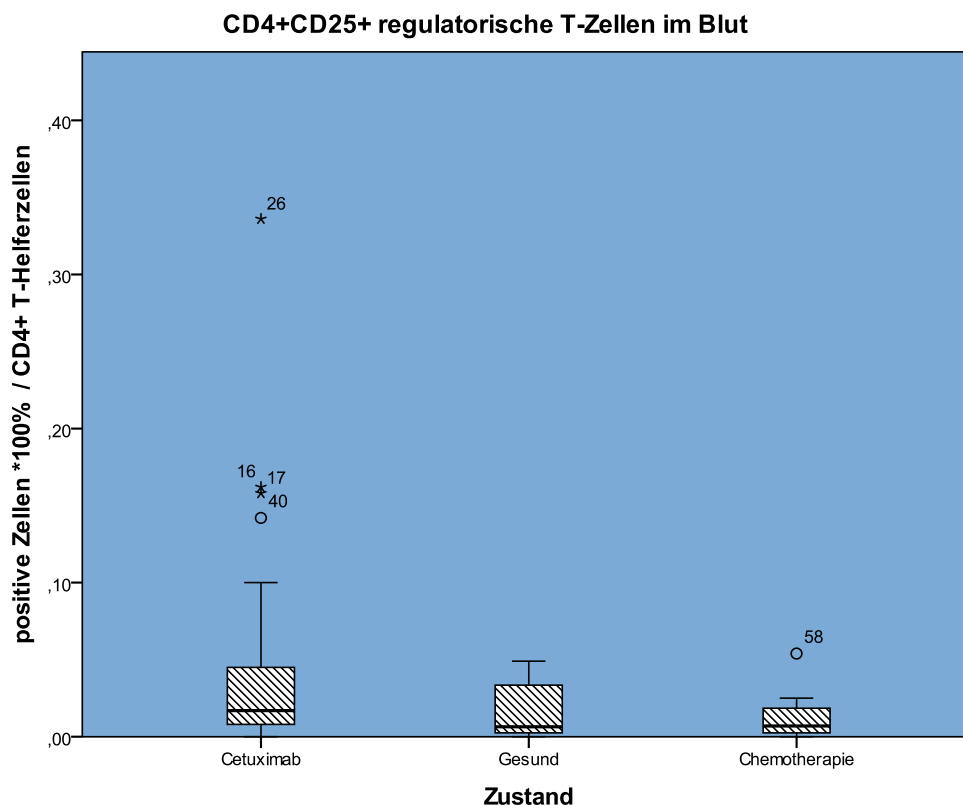
Während die CD3+ T-Zellen insgesamt bei mit Cetuximab-behandelten Patienten abnehmen, nimmt der Anteil der CD3+CD4+ T-Helferzellen an ihnen zu. Er ist, wie in Abbildung 9 dargestellt, bei Cetuximab-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht, im Vergleich zu Patienten unter Cetuximab-freier Chemotherapie ist der Unterschied jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 9: CD3+CD4+ T-Helferzellen sind bei mit Cetuximab behandelten Patienten erhöht**  
*Durchflusszytometrische Analyse der CD3+CD4+ T-Helferzellen aus Blut als Prozentsatz der CD3+ T-Zellen. Dieser Anteil an den CD3+ T-Zellen ist bei mit Cetuximab behandelten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant vermehrt ( $p=0,01$ ), nicht jedoch im Vergleich zur Chemotherapie-Kontrollgruppe. Die allgemeine Verminderung der CD3+ T-Zellen betrifft demnach die CD3+CD4+ T-Helferzellen weniger als die CD3+CD8+ zytotoxischen T-Zellen.*

Bei der mit Cetuximab behandelten Gruppe finden sich  $65,0\% \pm 15,3\%$  CD3+CD4+ T-Helferzellen, bei der gesunden Kontrollgruppe  $51,1\% \pm 13,1\%$  ( $p=0,01$ ) und bei der Chemotherapie-Kontrollgruppe  $58,9\% \pm 14,7\%$ . Die CD3+CD4+ T-Helferzellen scheinen von der Chemotherapie-bedingten Depletion der CD3+ T-Zellen weniger betroffen zu sein als CD3+CD8+ zytotoxische T-Zellen, dadurch erhöht sich ihr prozentualer Anteil an den Gesamt-T-Zellen.

Innerhalb der CD3+CD4+ T-Helferzellen nehmen insbesondere die CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen zu. Wie in Abbildung 10 dargestellt, stellen diese Zellen bei Cetuximab-behandelten Patienten einen höheren Anteil an den CD3+CD4+ T-Helferzellen als in den beiden Kontrollgruppen.

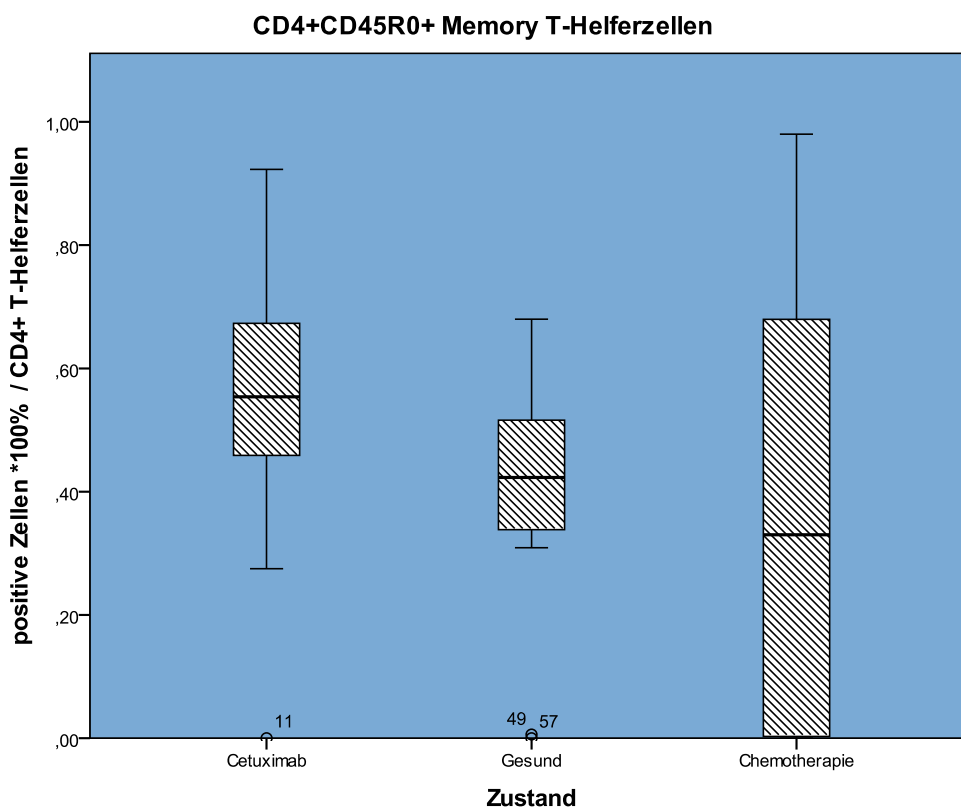


**Abbildung 10: CD25+CD4+ regulatorische T-Zellen sind unter Cetuximab erhöht**

*Durchflusszytometrische Analyse der CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen und der CD4+CD45R0+ Memory T-Helferzellen aus Blut als Prozentanteil an den CD4+ T-Zellen. Diese sind bei mit Cetuximab behandelten Patienten gegenüber der Chemotherapie-Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $p=0,02$ ), im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zeigt sich ein gleichgerichteter Trend ( $p=0,091$ ).*

Der Anteil der CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen an den CD3+CD4+ T-Helferzellen bei mit Cetuximab behandelten Patienten steigt an und ist gegenüber Patienten unter Cetuximab-freier Chemotherapie signifikant erhöht ( $p=0,02$ ). Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zeigt sich ein gleichgerichteter Trend ( $p=0,091$ ). Gegenüber der Chemotherapie-Kontrollgruppe ist der Effekt signifikant und damit nicht auf die Chemotherapie zurückzuführen. Bei mit Cetuximab behandelten Patienten finden sich  $3,8\% \pm 6,0\%$  CD3+CD4+ T-Helferzellen, bei der Chemotherapie-Kontrollgruppe  $0,9\% \pm 0,8\%$  und bei der gesunden Kontrollgruppe  $1,6 \pm 1,9\%$  CD3+CD4+ T-Helferzellen.

Mit Cetuximab-behandelte Patienten weisen, wie in Abbildung 11 dargestellt, mehr CD4+CD45R0+ Memory T-Helferzellen im Blut auf als die beiden Kontrollgruppen. Es ist somit bei Cetuximab-behandelten Patienten ein höherer Anteil der CD4+ T-Helferzellen eine Memory-Zelle als bei den Kontrollgruppen.



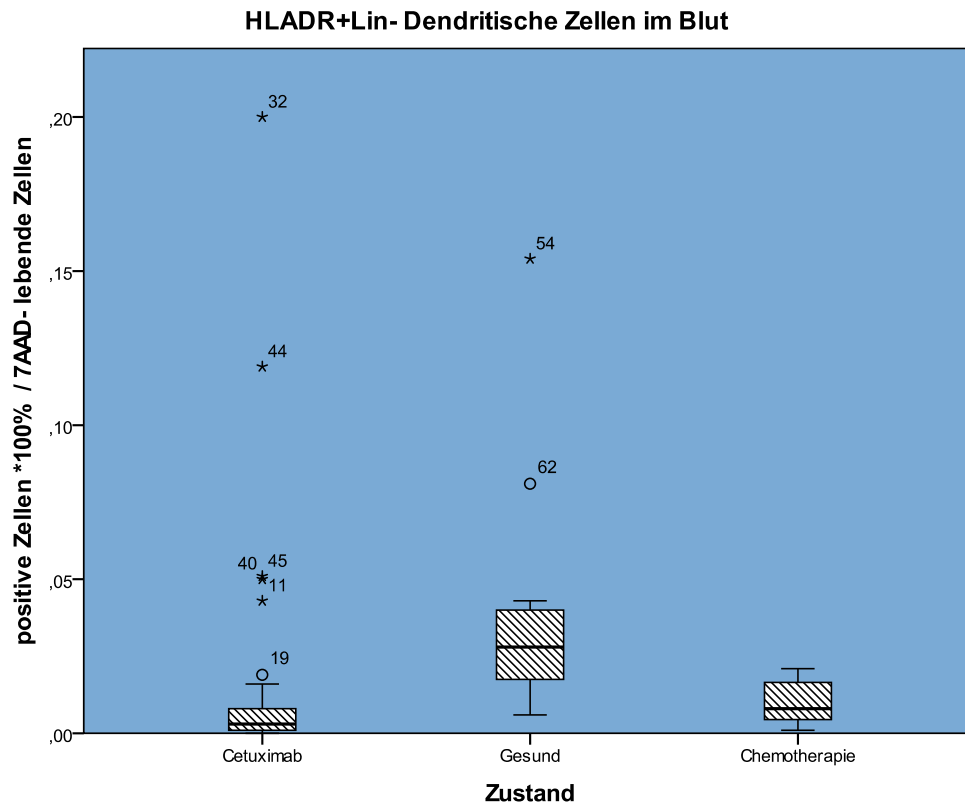
**Abbildung 11: CD45R0+CD4+ Memory T-Helferzellen sind unter Cetuximab vermehrt**

*Durchflusszytometrischen Analyse der CD4+CD45R0+ Memory T-Helferzellen aus Blut als Prozentanteil an den CD4+ T-Zellen. Diese sind im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen signifikant erhöht (Cetuximab / Gesund  $p=0,02$  und Cetuximab / Chemotherapie  $p=0,03$ ).*

Der Unterschied ist im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen signifikant. Bei der mit Cetuximab behandelten Gruppe finden sich  $56,9\% \pm 18,1\%$  CD4+CD45R0+ Memory T-Helferzellen, bei der gesunden Kontrollgruppe  $39,7\% \pm 22,7\%$  ( $p=0,02$ ) und bei der Chemotherapie-Kontrollgruppe  $35,5\% \pm 36,0\%$  ( $p=0,03$ ).

Im Blut der Cetuximab-behandelten Gruppe finden sich mit  $20,3\% \pm 19,3\%$  signifikant mehr CD8+CD45R0+ zytotoxische Memory Zellen als bei der Chemotherapie-Kontrollgruppe mit  $17,7\% \pm 22,6\%$  ( $p=0,02$ ). Der Unterschied zur gesunden Kontrollgruppe ist nicht signifikant. Die CD8+CD45R0+ zytotoxischen Memory T-Zellen zeigen also, bis auf eine stärkere Depletion unter reiner Chemotherapie, keine signifikante Veränderung.

In unseren Untersuchungen fanden sich, wie in Abbildung 12 dargestellt, bei den mit Cetuximab behandelten Patienten signifikant weniger HLADR+Lin- dendritische Zellen im Blut als bei gesunden Kontrollpersonen, jedoch mehr als bei Patienten unter einer Standard Chemotherapie.



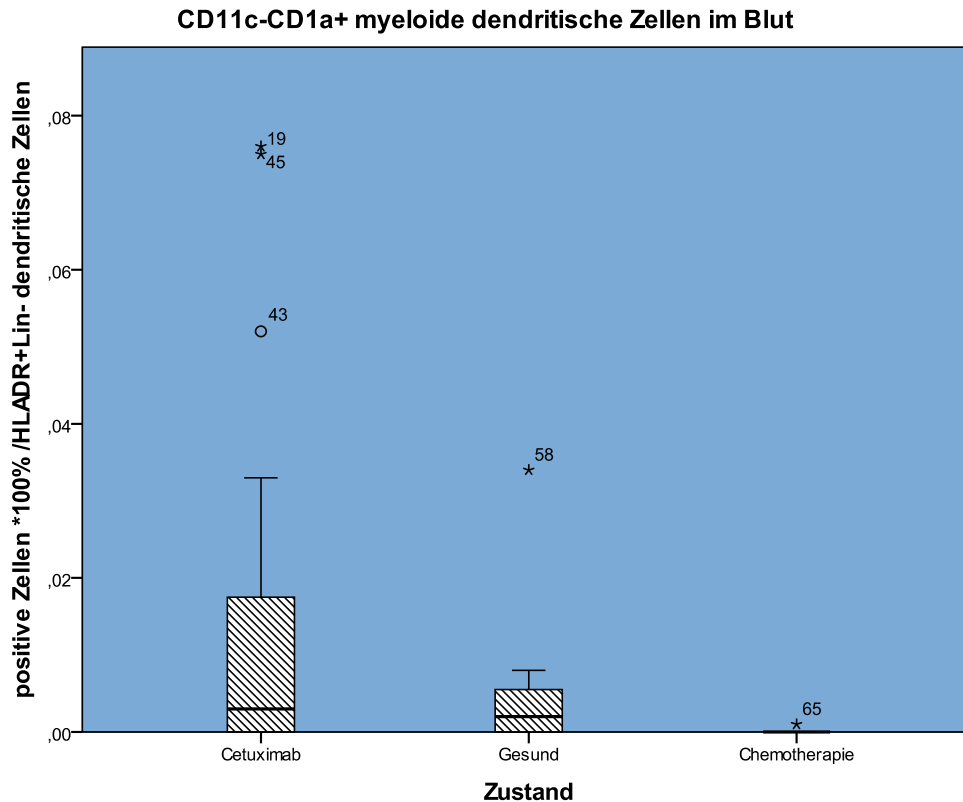
**Abbildung 12: HLADR+Lin- dendritische Zellen werden unter Cetuximab depletiert**

*Durchflusszytometrischen Analyse der HLADR+Lin- dendritischen Zellen im Blut als Anteil der 7AAD-lebenden Zellen. Diese sind bei mit Cetuximab behandelten Patienten gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe signifikant vermindert ( $p < 0,01$ ). Im Blut der Chemotherapie-Kontrollgruppe finden sich signifikant noch weniger HLADR+Lin- dendritische Zellen als bei mit Cetuximab behandelten Patienten ( $p = 0,02$ ). HLADR+Lin- dendritische Zellen sind also bei mit Chemotherapie behandelten Patienten mit oder ohne Cetuximab vermindert, bei einer Therapie ohne Cetuximab, deren Regime aggressive ist, noch mehr als unter Cetuximab-Therapie.*

Bei der mit Cetuximab behandelten Gruppe finden sich  $1,3\% \pm 3,3\%$  HLADR+Lin- dendritische Zellen, bei der gesunden Kontrollgruppe  $4,1\% \pm 4,3\%$  ( $p < 0,01$ ) und bei der Chemotherapie-Kontrollgruppe  $1\% \pm 0,7\%$  ( $p = 0,02$ ). HLADR+Lin- dendritische Zellen sind somit im Blut von chemotherapierten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen vermindert.

Während die HLADR+Lin- dendritischen Zellen insgesamt abnehmen, erhöht sich der Anteil der CD11c-C1a+ und der CD11c+CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen im Vergleich zur Chemotherapie-Kontrollgruppe signifikant. Gegenüber der gesunden

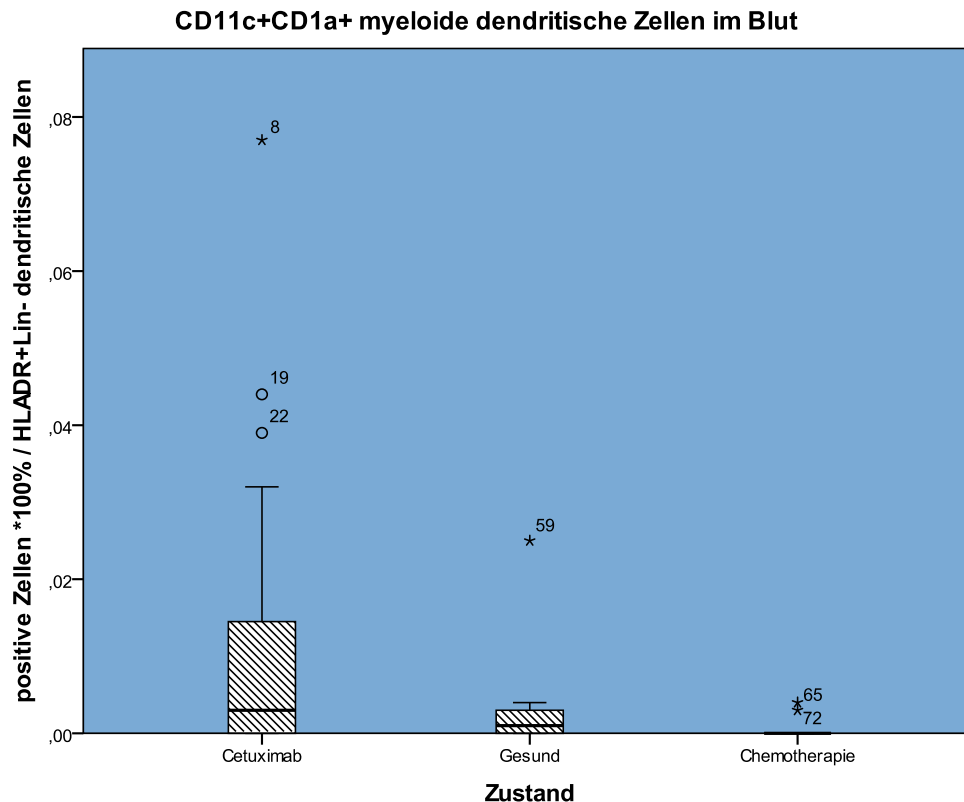
Kontrollgruppe ist dieser Anteil erhöht, aber der Unterschied ist nicht signifikant. Dies ist in Abbildung 13 und 14 entsprechend dargestellt.



**Abbildung 13: CD11c-CD1a+ myeloide dendritische Zellen nehmen unter Cetuximab zu**

*Durchflusszytometrische Analyse der CD11c-CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen im Blut. Der Anteil dieser Zellen nimmt bei Cetuximab-behandelten Patienten gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe und einer Chemotherapie-Kontrollgruppe zu. Der Unterschied zwischen Cetuximab-behandelten Patienten und der Chemotherapie-Kontrollgruppe ist signifikant ( $p < 0,01$ ).*

Bei der mit Cetuximab behandelten Gruppe finden sich  $1,1\% \pm 1,8\%$  CD11c-CD1a+ myeloide dendritische Zellen, bei der Chemotherapie-Kontrollgruppe  $0,0\% \pm 0,0\%$  ( $p < 0,01$ ) und bei der gesunden Kontrollgruppe  $0,5\% \pm 0,1\%$  (n.s.) CD11c-CD1a+ myeloide dendritische Zellen. CD11c+CD1a+ myeloide dendritische Zellen sind bei der mit Cetuximab behandelten Gruppe mit  $1\% \pm 1,5\%$ , bei der gesunden Kontrollgruppe mit  $0,4\% \pm 0,7\%$  (n.s.) und bei der Chemotherapie-Kontrollgruppe mit  $0,1\% \pm 0,1\%$  ( $p = 0,01$ ) zu finden.



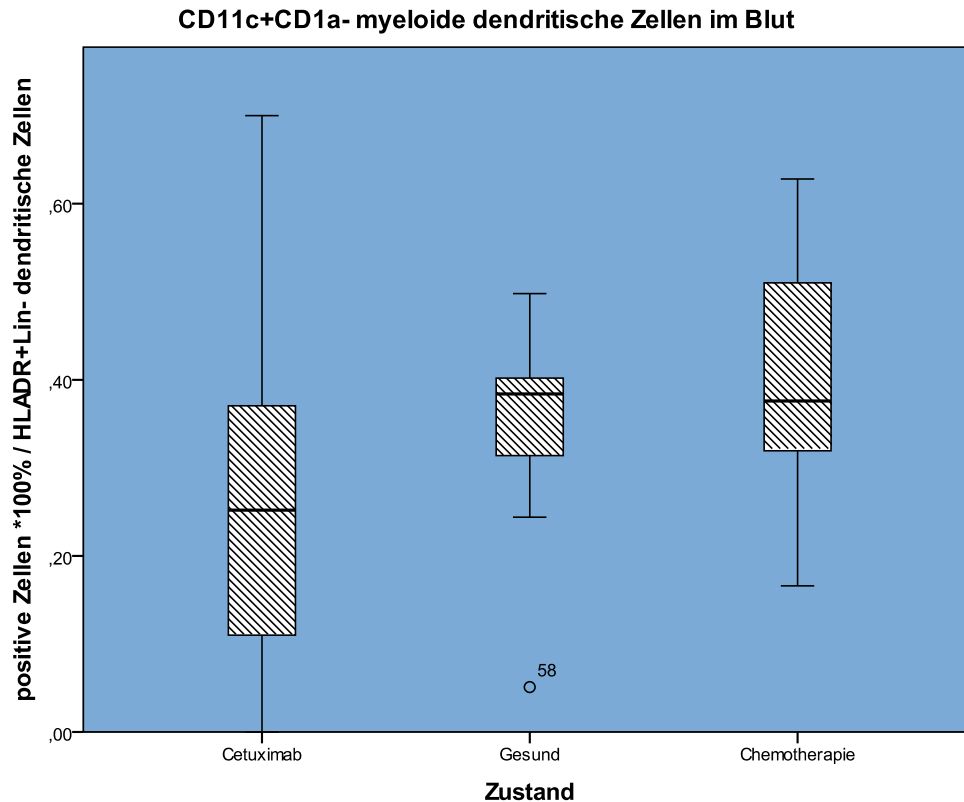
**Abbildung 14: CD11c+CD1a+ myeloide dendritische Zellen nehmen im Blut prozentual zu**  
*Durchflusszytometrischen Analyse der CD11c+CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen im Blut. Der Anteil dieser Zellen an den HLADR+Lin- dendritischen Zellen ist bei Cetuximab-behandelten Patienten gegenüber einer gesunde Kontrollgruppe und einer Chemotherapie-Kontrollgruppe erhöht. Im Fall der Chemotherapie-Kontrollgruppe ist der Unterschied signifikant ( $p=0,01$ ).*

Während die HLADR+Lin- dendritischen Zellen im Blut bei Patienten unter Chemotherapie ungeachtet des Cetuximabs stark abnehmen, erhöht sich der Anteil der CD11c-CD1a+ und der CD11c+CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen. Diese werden bei Cetuximab-Patienten in geringerem Maße depletiert als andere Populationen dendritischer Zellen. Bei der Chemotherapie-Kontrollgruppe kommt es dagegen zu einer ausgeprägten Depletion der CD11c-CD1a+ und der CD11c+CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen.

Im Gegensatz zu den CD11c+CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen werden, wie in Abbildung 15 dargestellt, die CD11c+CD1a- myeloiden dendritischen Zellen im Blut depletiert. Ihr Anteil an den HLADR+Lin- dendritischen Zellen nimmt bei Cetuximab-Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe ab, während er bei der



Chemotherapie-Kontrollgruppe aufgrund der starken Depletion der HLADR+Lin-dendritische Zellen prozentual sogar ansteigt.



**Abbildung 15: CD11c+CD1a- dendritischen Zellen werden im Blut depletiert**

*Durchflusszytometrische Analyse der jungen myeloiden dendritischen Zellen als Anteil an den HLADR+Lin- dendritischen Zellen. Der Anteil dieser Zellen an den HLADR+Lin- dendritischen Zellen ist bei Cetuximab-behandelten Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe und einer Chemotherapie-Kontrollgruppe vermindert. Im Fall der Chemotherapie-Kontrollgruppe ist der Unterschied signifikant ( $p=0,02$ ).*

Der Anteil der CD11c+CD1a- myeloiden dendritischen Zellen an den HLADR+Lin-dendritischen Zellen ist im Vergleich zur Chemotherapie-Kontrollgruppe signifikant, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nicht signifikant vermindert. Bei der mit Cetuximab behandelten Gruppe sind es  $26,8\% \pm 18,4\%$ , bei der gesunden Kontrollgruppe  $35,1\% \pm 12,3\%$  (n.s.) und bei der Chemotherapie-Kontrollgruppe  $40,9\% \pm 14,8\%$  ( $p=0,02$ ). CD11c+CD1a- myeloide dendritische Zellen werden bei Cetuximab-behandelten Patienten stärker depletiert als andere Populationen dendritischer Zellen. Bei der Chemotherapie-Kontrollgruppe, bei der die HLADR+Lin- dendritischen

Zellen sehr stark vermindert sind, handelt es sich bei den wenigen nachweisbaren dendritischen Zellen überwiegend um myeloide dendritische Zellen (CD11c+CD1a-).

Alle übrigen untersuchten Zellpopulationen im Blut, insbesondere die plasmazytoiden dendritischen Zellen und die NK-Zellen, wiesen zwischen den Cetuximab-behandelten Patienten und den Patienten und Probanden der beiden Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede auf. Die ausführlichen Untersuchungsergebnisse dieser Zellpopulationen sind im Anhang aufgeführt.

#### 4.1.1 Tabellarische Zusammenfassung

In Tabelle 4 sind die oben genannten Ergebnisse der statistischen Analyse der signifikant veränderten Lymphozytenpopulationen im Blut und in Tabelle 5 die der dendritischen Zellen im Blut zusammengefasst. Die genaue Gating-Strategie und die Untergliederung der Lymphozytenpopulationen sind unter 3.3.4 *Gating* näher beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CD3+ T-Zellen unter Chemotherapie vermindert sind. CD3+CD4+ T-Helferzellen widerstehen der Chemotherapie besser und können so ihren Anteil an den CD3+ T-Zellen erhöhen. Insbesondere CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen und CD4+CD45R0+ Memory T-Helferzellen sind bei Cetuximab-behandelten Patienten vermehrt. Dieser Effekt lässt sich nicht auf eine chemotherapeutische Behandlung zurückführen.

Antigene	Signifikanz		Mittelwerte		
	Cetuximab/Gesund	Cetuximab/Chemo	Cetuximab	Gesund	Chemo
CD3+	<b>0,00</b>	n.s.	20,6% ± 14,8%	44,4% ± 17,9%	16,4% ± 11,5%
CD4+	<b>0,01</b>	n.s.	65,0% ± 15,3%	51,1% ± 13,1%	58,9% ± 14,7%
CD45R0CD4+	<b>0,02</b>	<b>0,03</b>	56,9% ± 18,1%	39,7% ± 22,7%	35,5% ± 36,0%
CD25+CD4+	n.s.	<b>0,02</b>	3,8% ± 6,0%	1,6% ± 1,9%	0,9% ± 0,8%
CD45R0+CD8+	n.s.	<b>0,02</b>	20,3% ± 19,3%	19,9% ± 15,3%	17,7% ± 22,6%

**Tabelle 4: Durchflusszytometrische Analyse von Lymphozytenpopulationen im Blut unter Cetuximab, Chemotherapie und bei Gesunden**

*Der Anteil an CD3+ T-Zellen bezieht sich auf die 7AAD- lebenden Zellen und der Anteil der CD4+ T-Helferzellen bezieht sich auf die CD3+ T-Zellen. Die CD45R0+CD4+ Memory T-Helferzellen, die CD25+CD4+ regulatorischen T-Zellen und die CD45R0+CD8+ Memory zytotoxischen T-Zellen beziehen sich jeweils auf den Anteil der CD4+ T-Helferzellen, bzw. der CD8+ zytotoxischen T-Zellen, an den 7AAD- lebenden Zellen.*

Die HLADR+Lin- dendritischen Zellen nehmen insgesamt bei chemotherapierten Patienten mit oder ohne Cetuximab ab. Während die CD11c-CD1a+ und die CD11c+CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen ihren Anteil steigern können, werden die CD11c+CD1a- myeloiden dendritischen Zellen depletiert.

Antigene	Signifikanz		Mittelwerte und Standardabweichung		
	Cetuximab/Gesund	Cetuximab/Chemo	Cetuximab	Gesund	Chemo
HLADR+Lin-	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>	1,3% ± 3,3%	4,1% ± 4,3%	1% ± 0,7%
CD11c-CD1a+	n.s.	<b>0,00</b>	1,1% ± 1,8%	0,5% ± 0,1%	0,0% ± 0,0%
CD11c+CD1a-	n.s.	<b>0,02</b>	26,8% ± 18,4%	35,1% ± 12,3%	40,9% ± 14,8%
CD11c+CD1a+	n.s.	<b>0,01</b>	1% ± 1,5%	0,4% ± 0,7%	0,1% ± 0,1%

**Tabelle 5: Durchflusszytometrischen Analyse von Populationen dendritischer Zellen im Blut unter Cetuximab, Chemotherapie und bei Gesunden**

*Der Anteil HLADR+Lin- dendritischer Zellen bezieht sich auf die Lin- Zellen; der Anteil der CD11c-CD1a+ myeloide dendritische Zellen, der CD11c+CD1a- jungen myeloiden dendritischen Zellen und der CD11c+CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen bezieht sich auf die HLADR+Lin- dendritischen Zellen.*

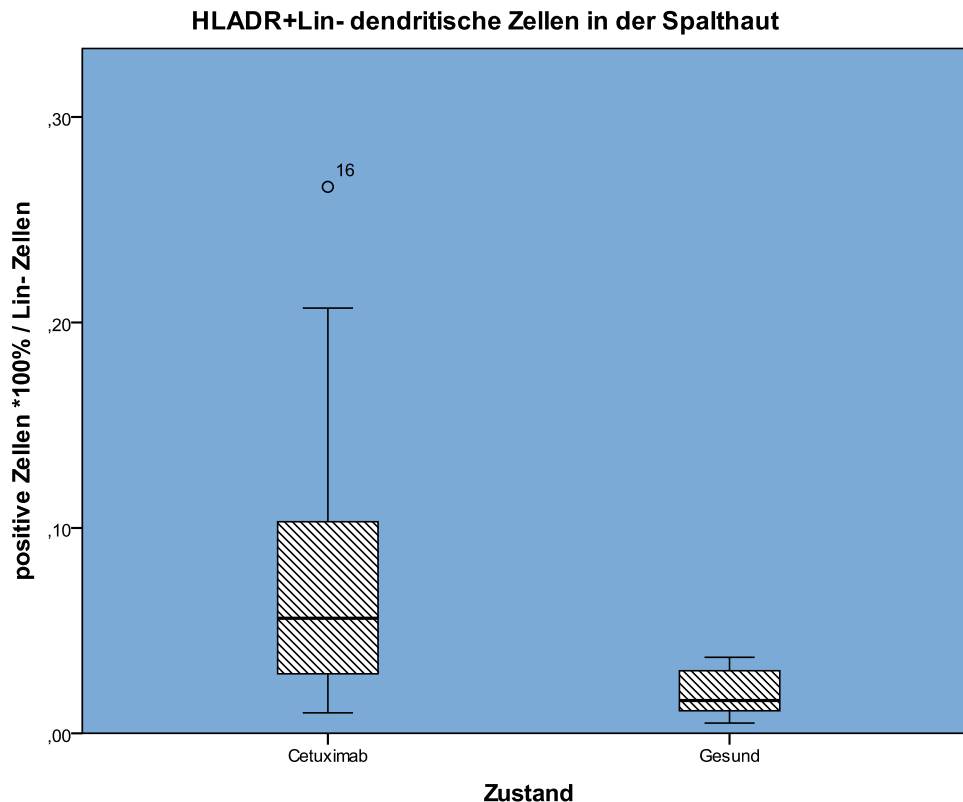
## 4.2 Haut

In den histologischen und immunhistologischen Färbungen der Vollhaut dominieren neben neutrophilen Granulozyten T-Zellen und entzündliche dendritische Zellen das Infiltrat des Cetuximab-induzierten Exanthems.

Charakterisiert man letztere weiter, so sind in der Epidermis insbesondere die CD206+ unreifen dendritische Zellen, die CD25+ regulatorischen T-Zellen und die Expression von humanem  $\beta$ -Defensin 2 erhöht. In der Dermis sind die CD3+ T-Zellen, die CD4+ T-Helferzellen, die CD8+ zytotoxischen T-Zellen, die CD45R0+ Memory T-Zellen und die BDCA2+ plasmazytoiden dendritischen Zellen erhöht.

### 4.2.1 *Epidermis*

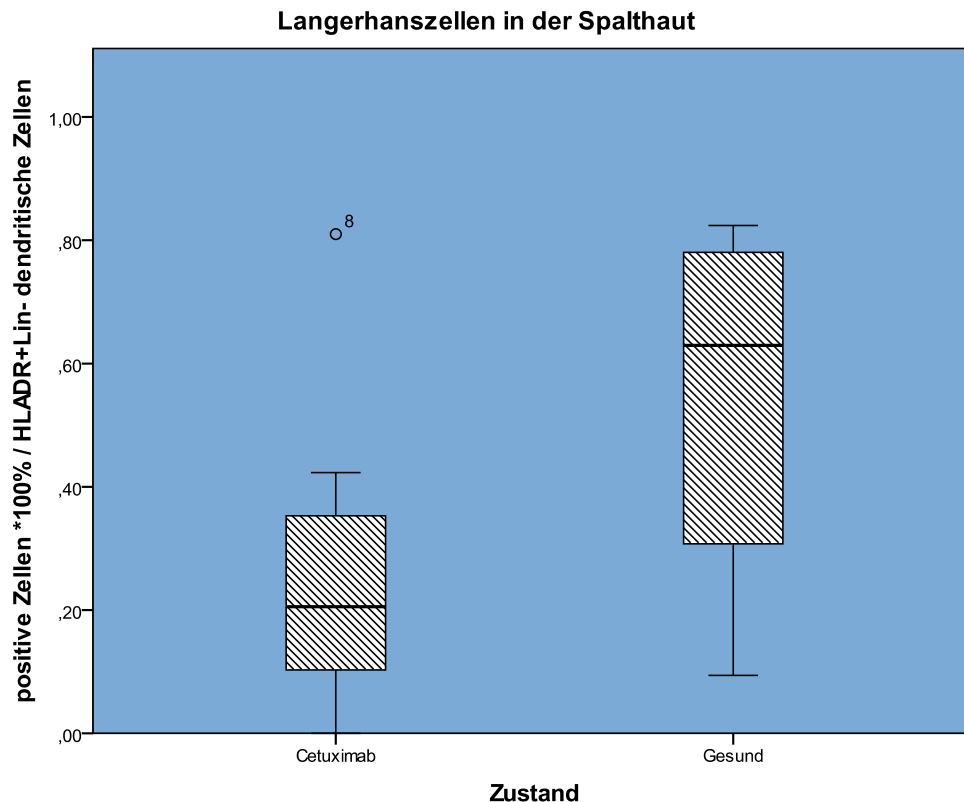
In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der HLADR+Lin- dendritische Zellen aus Spalthaut als Anteil an den Lin- Zellen bei Cetuximab-behandelten Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe dargestellt.



**Abbildung 16: HLADR+Lin- dendritische Zellen wandern in der Epidermis von Cetuximab-behandelten Patienten ein**

*Durchflusszytometrische Analyse HLADR+Lin- dendritischer Zellen in der Spalthaut. Diese sind bei Cetuximab-behandelten Patienten gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe signifikant vermehrt ( $p=0,02$ ).*

In den shave-Biopsien der Cetuximab-Patienten finden sich in der durchflusszytometrischen Analyse mit  $8,6 \pm 7,4\%$  signifikant mehr HLADR+Lin- dendritische Zellen als in denen der gesunden Kontrollgruppe mit  $2,0 \pm 1,9\%$  ( $p=0,02$ ). Diese wandern im Rahmen der Exanthementstehung in die Haut Cetuximab-behandelter Patienten ein. Nur in geringem Maße handelt es sich dabei um CD1a+CD11c- Langerhanszellen. Wie in Abbildung 17 dargestellt ist, nimmt deren Anteil an der Gesamtzahl der HLADR+Lin- dendritischen Zellen in der immunhistochemisch aufgearbeiteten Epidermis von  $54,4 \pm 27,5\%$  bei gesunden Kontrollpersonen auf  $23,9 \pm 20,5\%$  in der exanthematösen Haut signifikant ab ( $p=0,01$ ). Wie im Folgenden dargestellt werden soll, ist die Einwanderung von Immunzellen in die exanthematöse Haut von immaturren dendritischen Zellen und nicht von Langerhans-Zellen geprägt.

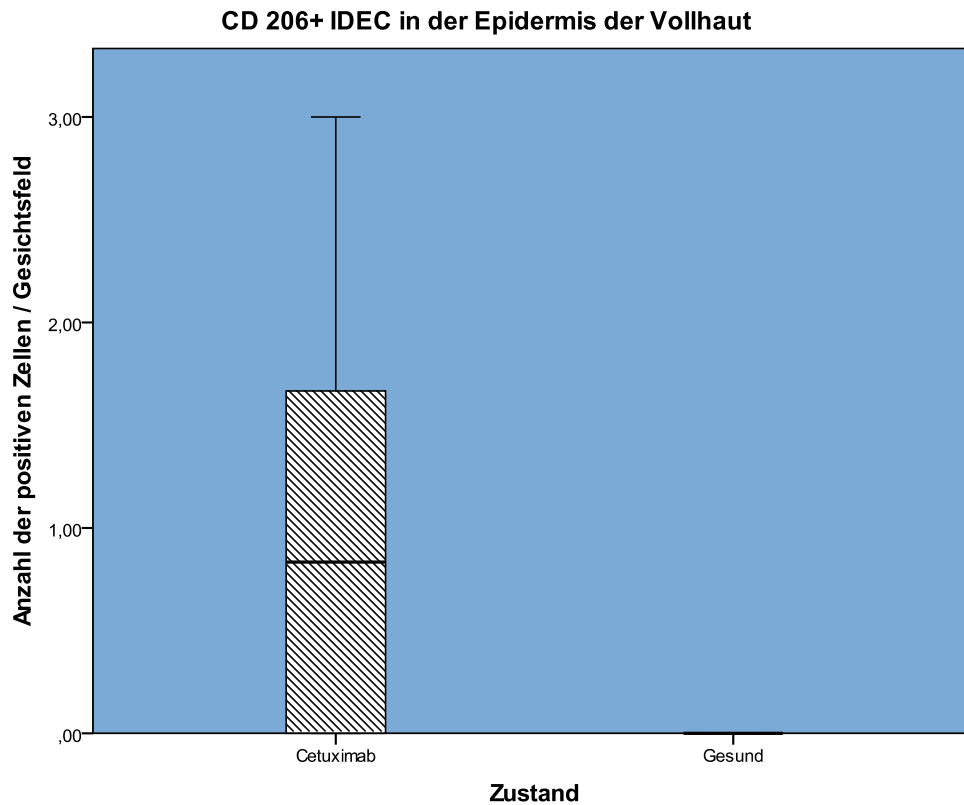


**Abbildung 17: Der Anteil der CD11c-CD1a+ Langerhanszellen an den epidermalen HLADR+Lin-dendritischen Zellen ist bei Cetuximab-behandelten Patienten vermindert**

*Durchflusszytometrischen Analyse der CD11c-CD1a+ Langerhanszellen in der Spalthaut. Der Anteil dieser Zellen an den HLADR+Lin- dendritischen Zellen ist bei Cetuximab-behandelten Patienten gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe signifikant vermindert ( $p=0,01$ ), während die Gesamtmenge der HLADR+Lin- dendritischen Zellen zunimmt (s. Abbildung 12).*

Unsere immunhistochemischen Untersuchungen an der exanthematösen Haut Cetuximab-behandelter Patienten erlauben einen Blick auf die eingewanderten Zellpopulationen. So finden sich in der Epidermis der mit Cetuximab behandelten Patienten im entzündlichen Infiltrat CD206+ IDEC, die in Abbildung 18 dargestellt sind, und CD25+ Zellen, die in Abbildung 19 dargestellt sind.

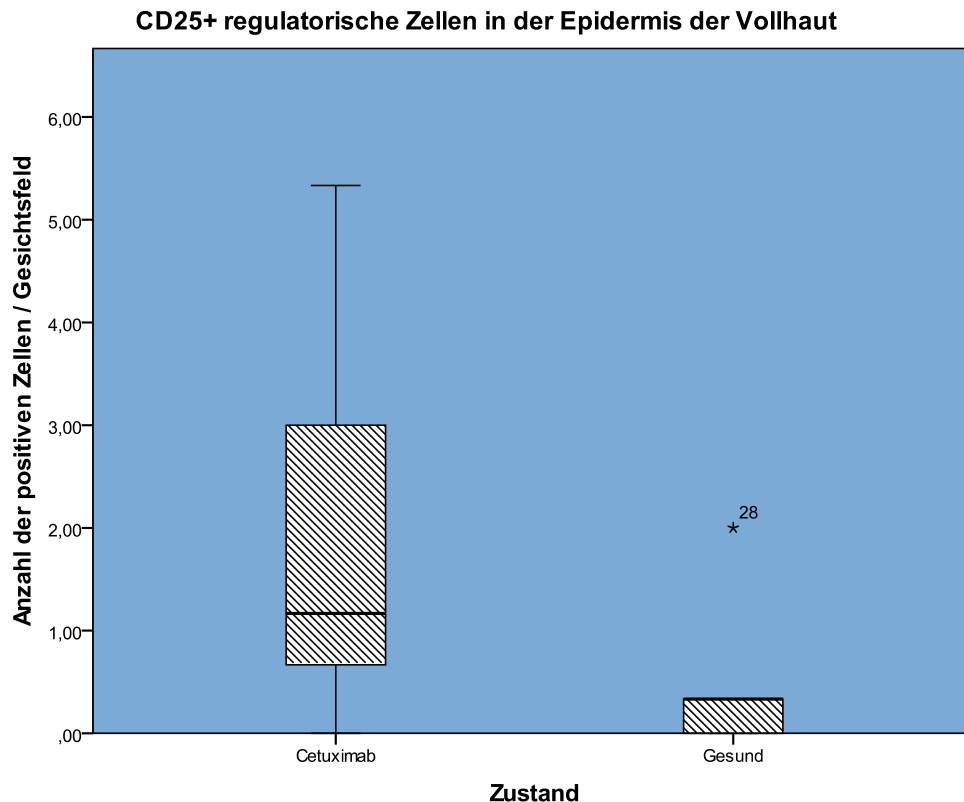
In der läsionalen Epidermis des Cetuximab-induzierten Exanthems lassen sich CD206+ IDEC ( $1,0 \pm 1,0$  Zellen pro Gesichtsfeld) nachweisen, während sie in gesunder Haut nicht präsent sind ( $0,0 \pm 0,0$  Zellen pro Gesichtsfeld). Der Unterschied ist hochsignifikant ( $p<0,01$ ).



**Abbildung 18: CD206+ IDEC finden sich im epidermalen entzündlichen Infiltrat bei Cetuximab-behandelten Patienten, jedoch nicht in gesunder Haut**

*Immunhistochemische Analyse des Cetuximab-induzierten Exanthems und gesunder Kontrollhaut. Bei mit Cetuximab behandelten Patienten finden sich in den entzündlichen Läsionen CD206+ inflammatorische dendritische epidermale Zellen (IDEC), die in der Epidermis gesunder Kontrollpersonen nicht auftauchen. Der Unterschied ist hochsignifikant ( $p < 0,01$ ).*

Außerdem finden sich, wie in Abbildung 19 dargestellt, im epidermalen entzündlichen Infiltrat bei mit Cetuximab-behandelten Patienten vermehrt CD25+ regulatorischen T-Zellen.

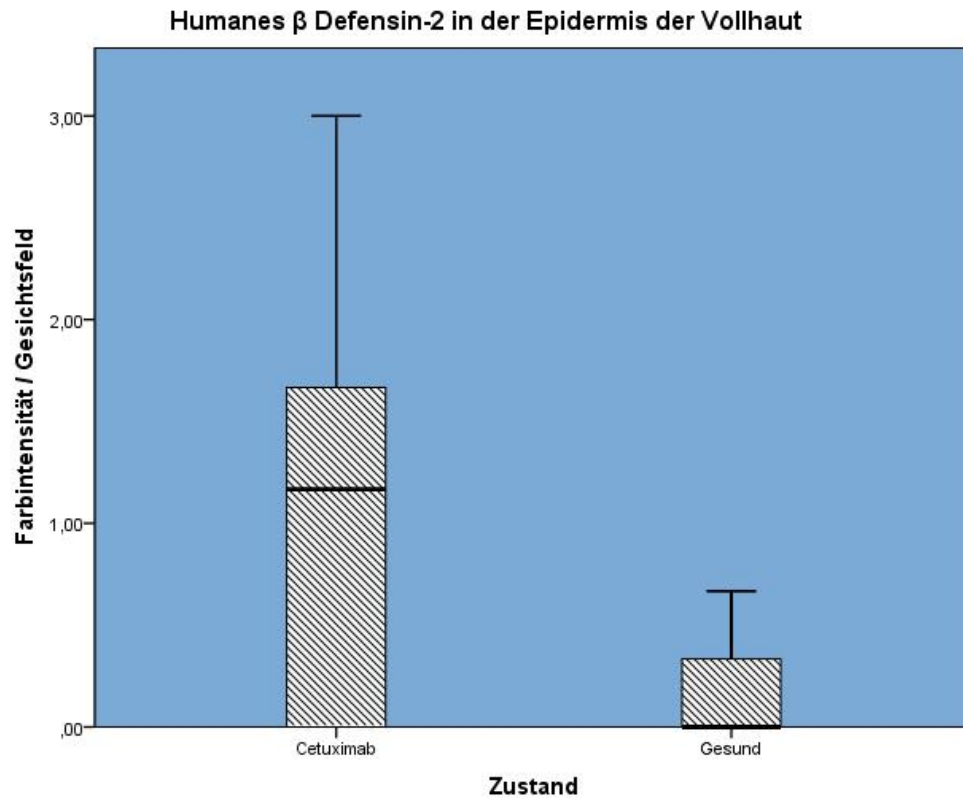


**Abbildung 19: Unter Cetuximab-Therapie erhöht sich die Zahl CD25+ regulatorische T-Zellen in der Epidermis**

*Immunhistochemische Analyse des Cetuximab-induzierten Exanthems und gesunder Kontrollhaut. Bei mit Cetuximab behandelten Patienten sind in den entzündlichen Läsionen die CD25+ regulatorischen T-Zellen signifikant erhöht ( $p=0,02$ ).*

Die CD25+ regulatorischen T-Zellen sind mit  $1,7 \pm 1,4$  Zellen pro Gesichtsfeld im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe mit  $0,5 \pm 0,8$  Zellen pro Gesichtsfeld signifikant erhöht ( $p=0,02$ ).

Zusätzlich zur Infiltration mit Entzündungszellen ist in der Epidermis von Cetuximab-behandelten Patienten die Expression von humanem  $\beta$ -Defensin 2 erhöht. Diese Expression ist in Abbildung 20 im Vergleich zu der bei gesunden Kontrollpersonen dargestellt. Die Expression von humanem  $\beta$ -Defensin 2 in der Epidermis der mit Cetuximab behandelten Patienten ist mit einer Farbintensität von  $1,1 \pm 0,9$  im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe mit einer Farbintensität von  $0,2 \pm 0,3$  signifikant erhöht ( $p=0,05$ ).



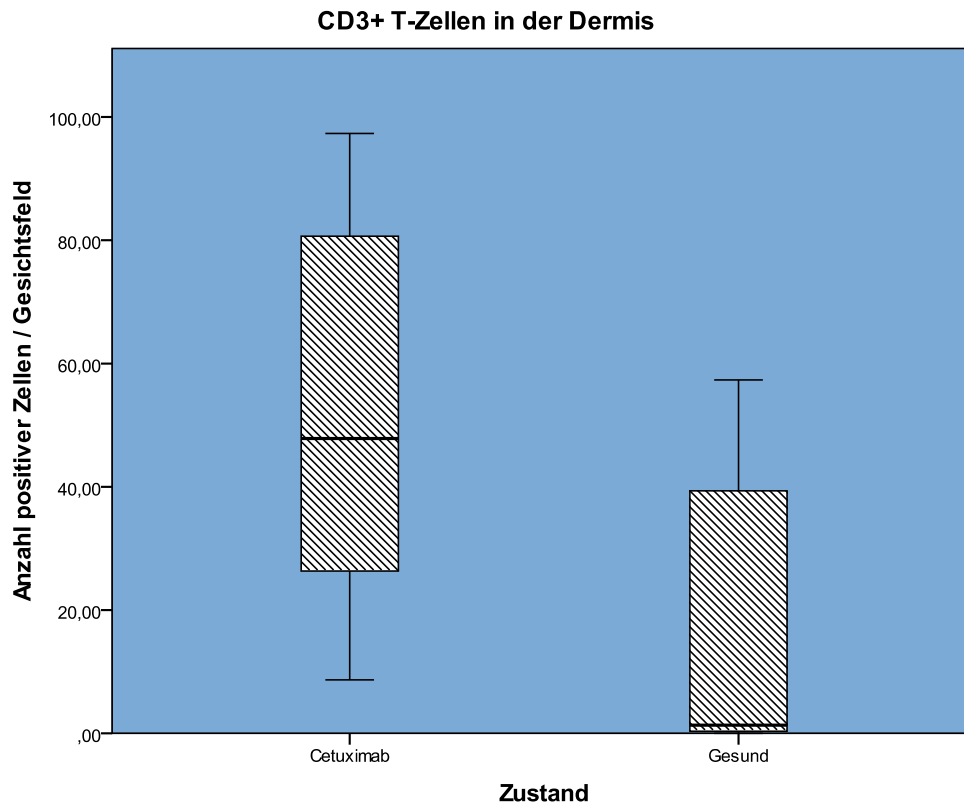
**Abbildung 20: Humanes  $\beta$ -Defensin 2 wird im Cetuximab-induzierten Exanthem vermehrt exprimiert**

*Immunhistochemische Analyse der Expressionsintensität des humanen  $\beta$ -Defensins 2 (Beurteilungsskala 0-3) in der Epidermis von Vollhaut. Diese ist bei Cetuximab-behandelten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht ( $p=0,05$ ).*

#### **4.2.2 Dermis**

In Abbildung 21 sind die CD3+ T-Zellen in der Dermis bei Cetuximab-behandelten Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe dargestellt.

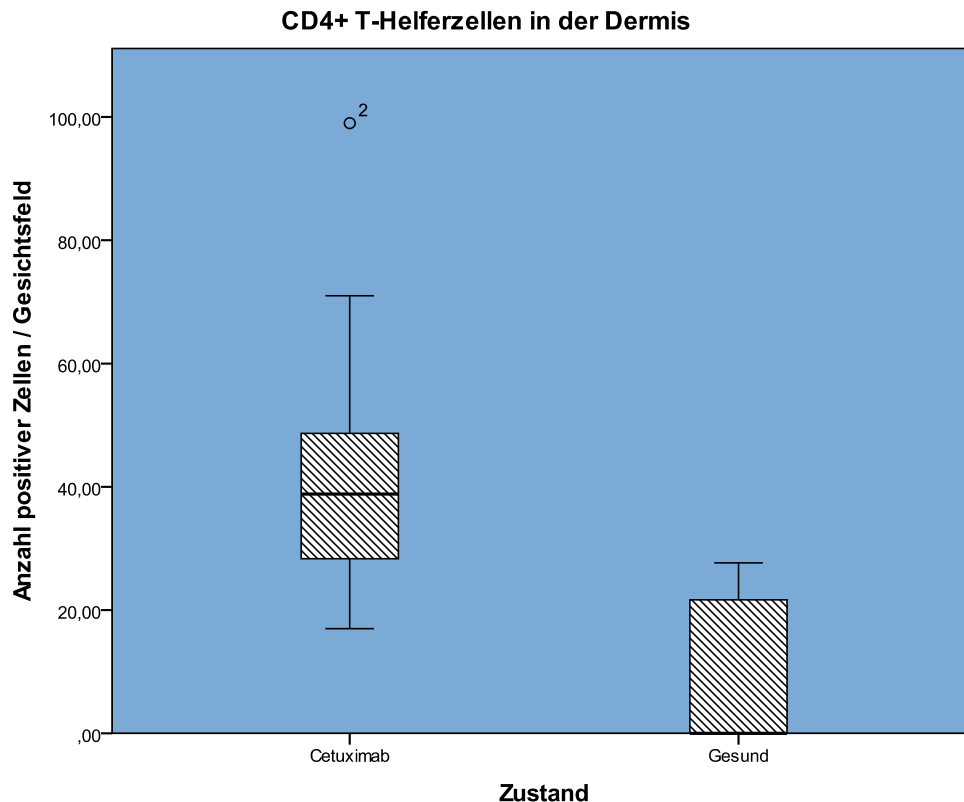




**Abbildung 21: Das dermale Infiltrat bei Cetuximab-behandelten Patienten besteht überwiegend aus CD3+ T-Zellen**

*Immunhistochemische Analyse CD3+ T-Zellen in der Dermis von Vollhaut. Diese sind bei mit Cetuximab behandelten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht ( $p=0,03$ ) und bilden maßgeblich das dermale entzündliche Infiltrat.*

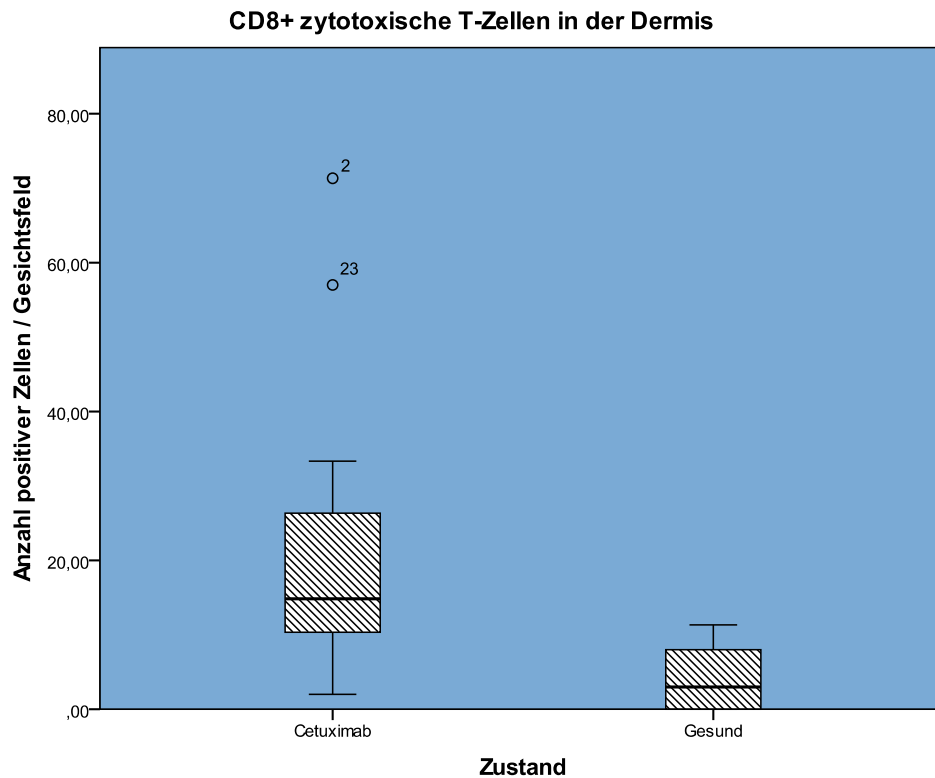
In der Dermis der mit Cetuximab behandelten Patienten sind die CD3+ T-Zellen mit  $51,1 \pm 26,7$  Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe mit  $19,6 \pm 26,9$  Zellen signifikant erhöht ( $p=0,03$ ) und bilden maßgeblich das dermale entzündliche Infiltrat. Wie in Abbildung 22 dargestellt, sind etwa zwei Drittel davon CD4+ T-Helferzellen. Diese sind bei mit Cetuximab behandelten Patienten mit  $41,9 \pm 19,0$  Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe mit  $9,9 \pm 13,7$  hochsignifikant vermehrt ( $p<0,01$ ).



**Abbildung 22: CD4+ T-Helferzellen überwiegen im dermalen Infiltrat bei Cetuximab-behandelten Patienten**

*Immunhistochemische Analyse CD4+ T-Helferzellen in der Dermis von Vollhaut. Diese sind bei mit Cetuximab behandelten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen hochsignifikant erhöht ( $p < 0,01$ ).*

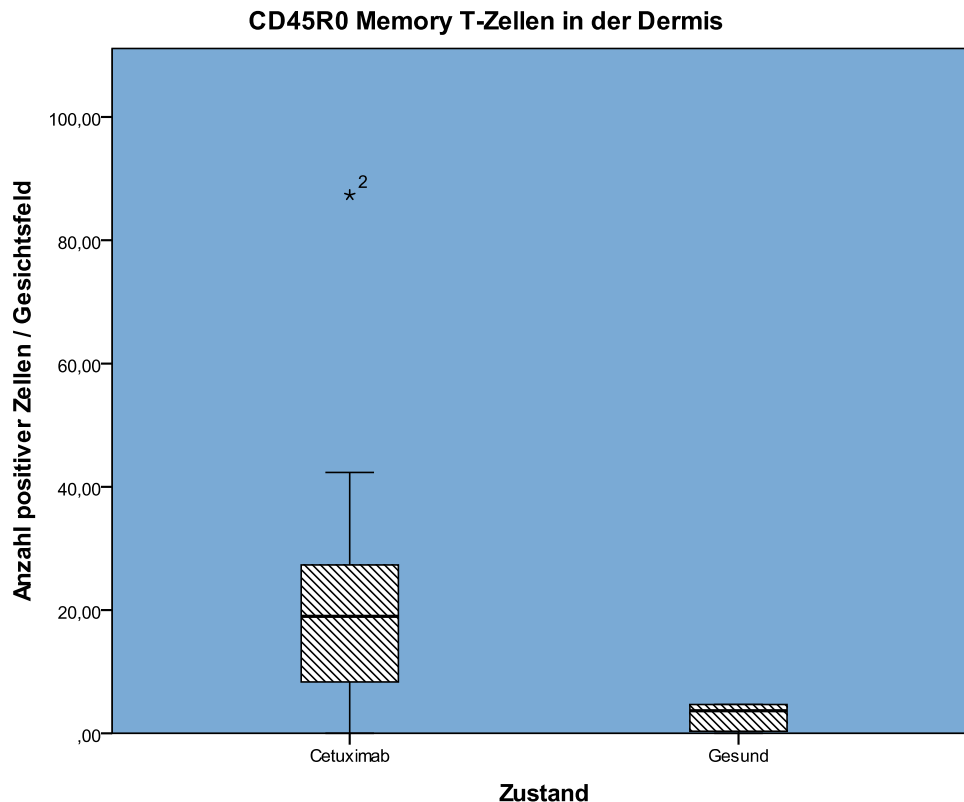
Die Anzahl der CD8+ zytotoxischen T-Zellen in der Dermis bei Cetuximab-behandelten Patienten ist, wie in Abbildung 23 dargestellt, geringer als die der CD4+ T-Helferzellen und stellt nur etwa ein Drittel der CD3+ T-Zellen. Trotzdem sind sie bei mit Cetuximab behandelten Patienten mit  $19,6 \pm 15,8$  Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe mit  $4,5 \pm 5,0$  Zellen hochsignifikant erhöht ( $p < 0,01$ ), da durch das Infiltrat die absolute Zellzahl erhöht ist.



**Abbildung 23: Etwa ein Drittel der CD3+ T-Zellen des dermalen Infiltrats bei Cetuximab-behandelten Patienten sind CD8+ T-Zellen**

*Immunhistochemische Analyse CD8+ zytotoxischer T-Zellen in der Dermis von Vollhaut. Diese sind bei mit Cetuximab behandelten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen hochsignifikant erhöht ( $p < 0,01$ ) und stellen etwa ein Drittel der T-Zellen im dermalen Infiltrat bei Cetuximab-behandelten Patienten.*

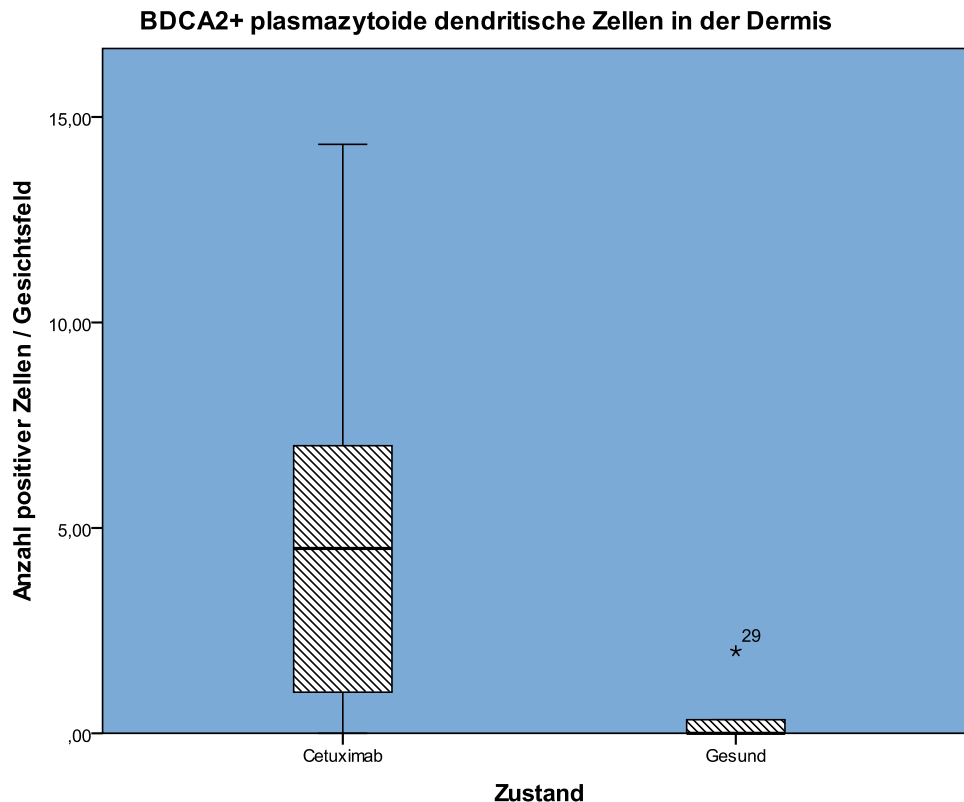
Wie aus Abbildung 24 ersichtlich, finden sich im dermalen Infiltrat bei Cetuximab-behandelten Patienten auch vermehrt CD45R0+ Memory T-Zellen, ihre Zahl entspricht knapp der Hälfte der CD3+ T-Zellen. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe mit  $2,7 \pm 2,3$  Zellen sind die CD45R0+ Memory T-Zellen mit  $20,1 \pm 18,2$  Zellen hochsignifikant erhöht ( $p = 0,01$ ).



**Abbildung 24: CD45R0+ Memory T-Zellen sind bei Cetuximab-behandelten Patienten erhöht**

*Immunhistochemische Analyse CD45R0+ Memory T-Zellen in der Dermis. Diese sind bei mit Cetuximab behandelten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht ( $p=0,01$ ). Ihre Zahl entspricht fast der Hälfte der CD3+ T-Zellen im dermalen Infiltrat.*

Das dermale Infiltrat bei mit Cetuximab-behandelten Patienten enthält vermehrt BDCA2+ plasmazytoide dendritische Zellen, während sie in gesunder Haut fast nicht vorkommen. Wie in Abbildung 25 dargestellt, sind bei Cetuximab-behandelten Patienten die BDCA2+ plasmazytoiden dendritischen Zellen mit  $4,5 \pm 3,5$  Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe mit  $0,5 \pm 0,9$  Zellen hochsignifikant erhöht ( $p<0,01$ ).



**Abbildung 25: Das dermale Infiltrat bei Cetuximab-behandelten Patienten enthält BDCA2+ plasmazytoide dendritische Zellen, die bei Gesunden fast nicht vorkommen**

*Immunhistochemische Analyse CD3+ T-Zellen in der Dermis von Vollhaut. Diese sind bei mit Cetuximab behandelten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ).*

#### **4.2.3 Tabellarische Zusammenfassung**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HLADR+Lin- dendritische Zellen im Verlauf der Exanthementstehung in die Epidermis einwandern. Der überwiegende Teil davon sind inflammatorische dendritische Zellen (IDEC) und nur wenige CD1a+CD11c- Langerhanszellen, deren Anteil an der Gesamtzahl der dendritischen Zellen sich dadurch vermindert. Zusätzlich treten in der entzündeten Epidermis signifikant vermehrt CD25+ regulatorischen Zellen auf.

Das dermale Infiltrat besteht aus CD3+ T-Zellen, wobei die Anzahl der CD4+ T-Helferzellen in etwa doppelt so hoch ist wie die der CD8+ zytotoxischen T-Zellen. Dieses dermale Infiltrat enthält auch BDCA2+ plasmazytoide dendritische Zellen, welche in gesunder Haut fast nicht vorkommen und, im Gegensatz zu den IDEC, auch nicht in der läsionalen Epidermis.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Spalthaut zusammengefasst.

Antigene	Signifikanz	Mittelwerte und Standardabweichung	
	Cetuximab/Gesund	Cetuximab	Gesund
Lin-HLADR+	0,02	8,6% ± 7,4%	2% ± 1,9%
CD11c-CD1a+	0,01	23,9% ± 20,5%	54,4% ± 27,5%

**Tabelle 6: Statistisch signifikante Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von Populationen dendritischer Zellen in der Spalthaut unter Cetuximab und bei Gesunden**

*Der Anteil HLADR+Lin- dendritischer Zellen bezieht sich auf die Lin- Zellen; der Anteil der CD11c-CD1a+ Langerhans-Zelle bezieht sich auf die HLADR+Lin- dendritischen Zellen.*

Die epidermal signifikant veränderten Zellpopulationen und antimikrobiellen Peptide sind in Tabelle 7, die dermalen in Tabelle 8 zusammengefasst.

Epidermal Antigene	Signifikanz	Mittelwerte und Standardabweichung	
	Cetuximab/Gesund	Cetuximab	Gesund
CD25+	0,02	1,7 ± 1,4	0,5 ± 0,8
CD206	0,02	1,0 ± 1,0	0,0 ± 0,0
HBD2	0,05	1,1 ± 0,9 (Farbintensität)	0,2 ± 0,3 (Farbintensität)

**Tabelle 7: Statistisch signifikante Ergebnisse der immunohistochemischen Analyse von Lymphozytenpopulationen, Populationen dendritischer Zellen und von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) in der Epidermis der Vollhaut unter Cetuximab und bei Gesunden**

*Die CD25+ regulatorischen T-Zellen und die CD206+ IDEC wurden in 3 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern ausgezählt und gemittelt, für das humane  $\beta$ -Defensin 2 wurde ebenfalls in 3 Gesichtsfeldern die Färbeintensität der Epidermis auf einer Skala von 0 bis 3 beurteilt und gemittelt.*

Dermal Antigene	Signifikanz	Mittelwerte und Standardabweichung	
	Cetuximab/Gesund	Cetuximab	Gesund
CD3+	0,03	51,1 ± 26,7	19,6 ± 26,9
CD4+	0,00	41,9 ± 19,0	9,9 ± 13,7
CD8+	0,00	19,6 ± 15,8	4,5 ± 5,0
CD45R0	0,01	20,1 ± 18,2	2,7 ± 2,3
BDCA2	0,00	4,5 ± 3,5	0,5 ± 0,9

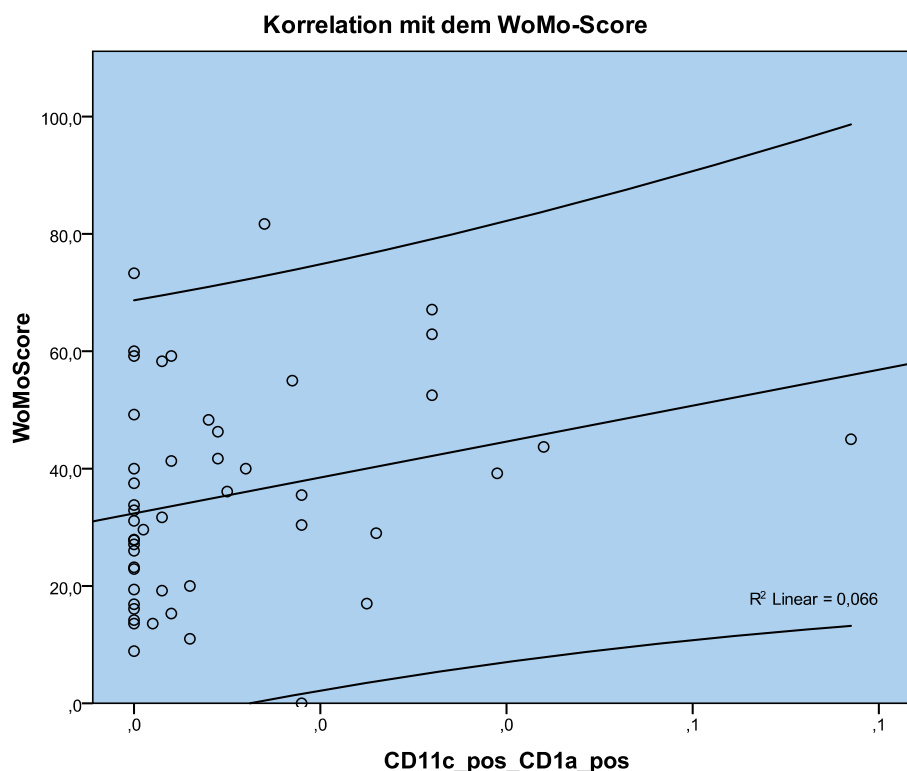
**Tabelle 8: Statistisch signifikante Ergebnisse der immunohistochemischen Analyse von Lymphozytenpopulationen, Populationen dendritischer Zellen und antimikrobiellen Peptiden (AMPs) in der Dermis unter Cetuximab und bei Gesunden**

*Die markierten Zellen wurden in je 3 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern ausgezählt und anschließend gemittelt.*

#### 4.3 Exanthemgrad, immunbiologische Parameter und das Therapieansprechen: Zusammenhänge

Die Korrelationsanalyse der signifikant veränderten Zellpopulationen und antimikrobiellen Peptide mit dem WoMo- und dem WoMax-Score wurde durchgeführt um eventuell bestehende Zusammenhänge zwischen Exanthemgrad und immunologischen Veränderungen aufzeigen.

In Abbildung 26 ist die Korrelationsgerade zwischen CD11c+CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen im Blut und dem WoMo-Score dargestellt.



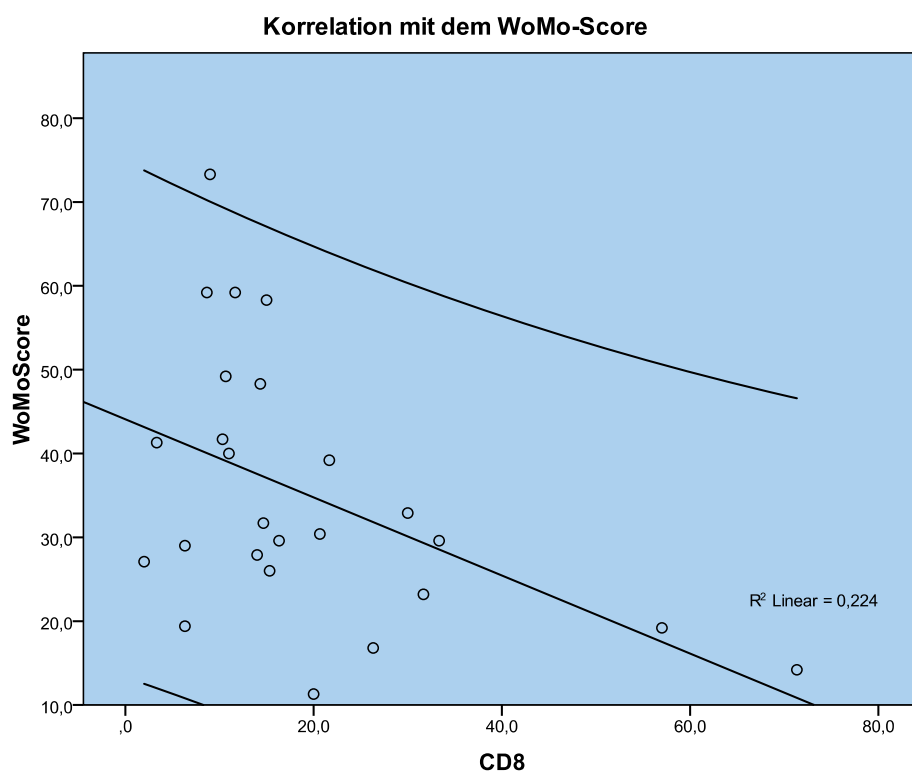
**Abbildung 26: CD11c+CD1a+ myeloide dendritische Zellen im Blut korrelieren positiv mit dem WoMo-Score**

*Darstellung der Korrelation zwischen CD11c+CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen und dem WoMo-Score mit der Korrelationsgeraden (Korrelationskoeffizient  $r=0,303$ , Bestimmtheitsmaß  $r^2= 0,066$ ) und dem Konfidenzintervall von 95%.*

Die CD11c+CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen im Blut korrelieren schwach positiv mit dem WoMo-Score ( $p=0,035$  nach Spearman). WoMo- und WoMax-Score sind ein Maß für die Stärke und das Ausmaß der Hautveränderungen unter Cetuximab-Therapie (für Details, s. Material und Methoden 3.1.3).

Der Korrelationskoeffizient  $r$  ergibt für die Korrelation der CD1a+CD11c+ myeloiden dendritischen Zellen im Blut mit dem WoMo-Score einen Wert von 0,303, die Signifikanz beträgt 0,035 und das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  0,066.

In der Haut korrelieren die dermalen CD8+ zytotoxischen T-Zellen schwach negativ mit dem WoMo- und dem WoMax-Score ( $p=0,025$  und  $p=0,20$  nach Spearman, respektive). In Abbildung 27 ist die Korrelation der dermalen zytotoxischen T-Zellen mit dem WoMo-Score dargestellt.



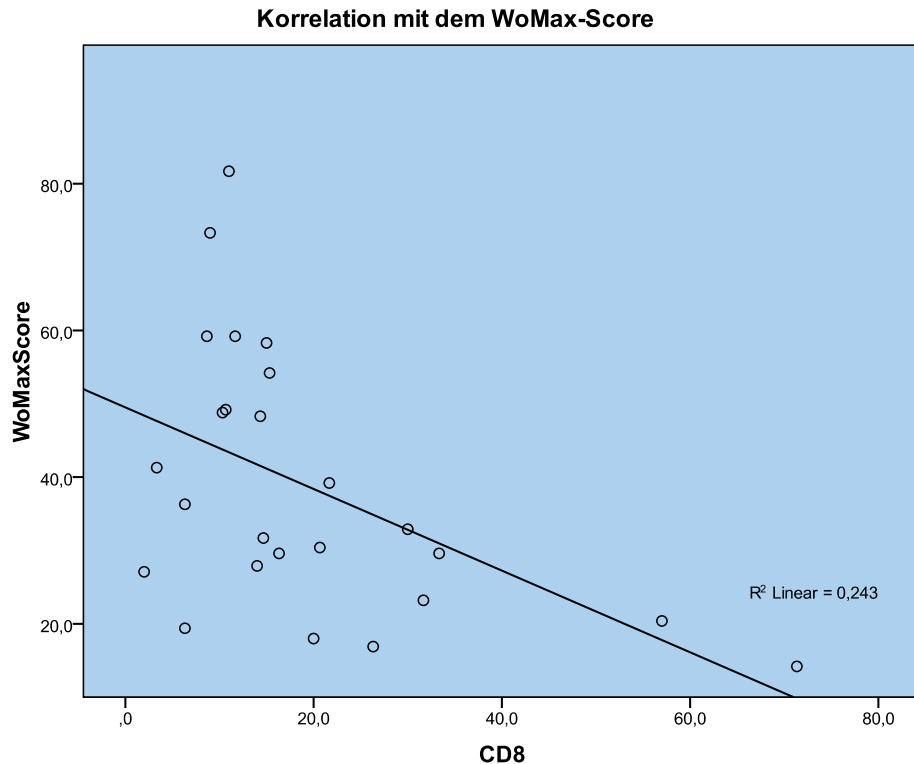
**Abbildung 27: Dermale CD8+ zytotoxische T-Zellen korrelieren negativ mit dem WoMo-Score**

Korrelation zwischen den dermalen CD8+ zytotoxischen T-Zellen und dem WoMo-Score mit der Korrelationsgerade (Korrelationskoeffizient  $r=-0,448$ , Bestimmtheitsmaß  $r^2= 0,224$ ) und dem Konfidenzintervall von 95%.

Der Korrelationskoeffizient  $r$  ergibt für die Korrelation zwischen dermalen CD8+ zytotoxischen T-Zellen und dem WoMo-Score einen Wert von -0,448, die Signifikanz beträgt 0,025 und das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  0,224.

In Abbildung 28 ist die Korrelation zwischen den dermalen CD8+ zytotoxischen T-Zellen und dem WoMax-Score dargestellt.





**Abbildung 28: Dermale CD8+ zytotoxische T-Zellen korrelieren negativ mit dem WoMax-Score**

*Korrelation zwischen den dermalen CD8+ zytotoxischen T-Zellen und dem WoMax-Score mit der Korrelationsgerade (Korrelationskoeffizient  $r = -0,463$ , Bestimmtheitsmaß  $r^2 = 0,243$ ).*

Die Berechnung des Korrelationskoeffizient  $r$  ergibt für die Korrelation zwischen dermalen CD8+ zytotoxischen T-Zellen und dem WoMax-Score einen Wert von  $-0,463$ , die Signifikanz beträgt  $0,02$  und das Bestimmtheitsmaß  $r^2$   $0,243$ .

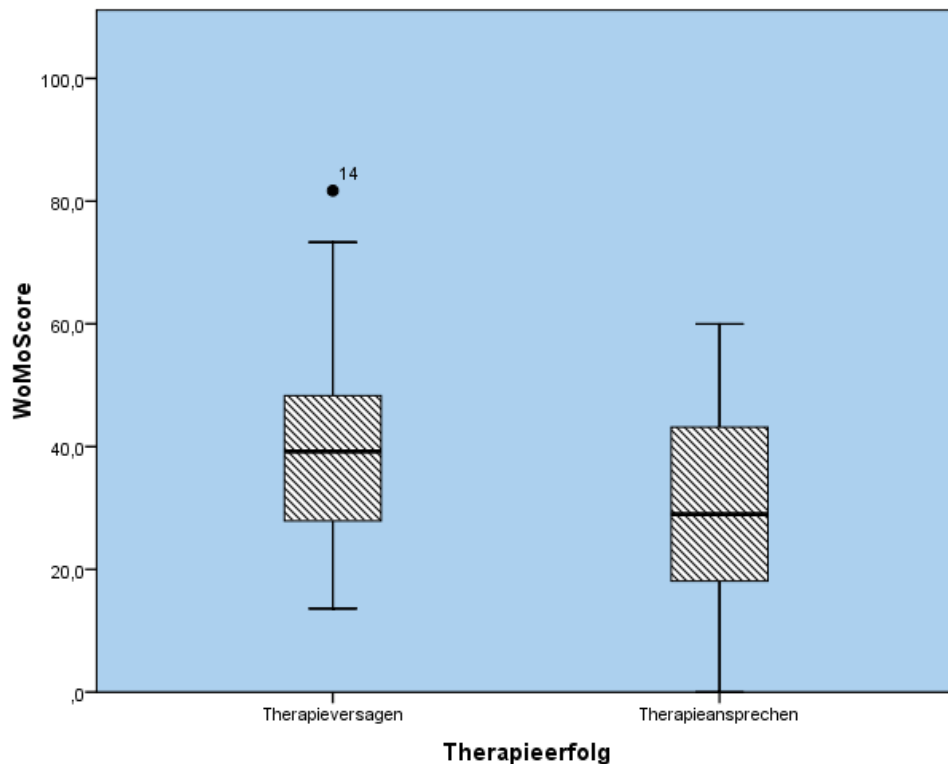
Keine andere der untersuchten signifikant veränderten Zellpopulationen oder der antimikrobiellen Peptide aus dem Blut oder in der Haut korreliert mit dem WoMo- oder dem WoMax-Score.

## **4.4 Therapieansprechen**

Bei 51 von den 54 in die Studie eingeschlossenen Patienten konnten Daten zum Ansprechen der Grunderkrankung auf die Therapie mit Cetuximab erhoben werden. Unter der Cetuximab-Therapie mit oder ohne begleitende Chemotherapie (siehe 3.1.1 „Die Cetuximab-Gruppe“ für Details zur Therapie) kam es bei 46,3% (25 von 54) der Patienten zu einer Krankheitsprogression („progressive disease“) und bei insgesamt 53,7% (29 von 54) zu einem Ansprechen auf die Cetuximab-Therapie. Dabei konnte bei 31,5% (17 von 54) ein Fortschreiten der Erkrankung zeitweise aufgehalten werden („stable disease“), bei 22,2% (12 von 54) wurde eine Verminderung der Tumorgröße erzielt („partial remission“). Die Patienten konnten daher zu 53,7% als ansprechende auf die Therapie und zu 46,3% als nicht ansprechende auf die Therapie klassifiziert werden.

### **4.4.1 Therapieansprechen und Exanthem**

Im Gegensatz zur Mehrzahl der veröffentlichten Studien zeigten Patienten, die auf die Therapie mit Cetuximab mit einem Stillstand des Tumorwachstums („stable disease“) oder einer Reduktion des Tumolvolumens („partial remission“) reagierten, in unseren Untersuchungen ein im Vergleich zu Patienten mit Tumorprogression geringer ausgeprägtes Exanthem. Dieser Unterschied in der mit dem WoMo-Score quantitativ erfassten Exanthemstärke ließ sich zwischen den beiden Gruppen mit einer Signifikanz von  $p = 0,069$  nachweisen. In Abbildung 29 ist die Verteilung des WoMo-Scores als quantitatives Maß für den Exanthemgrad nach dem Therapieansprechen dargestellt.



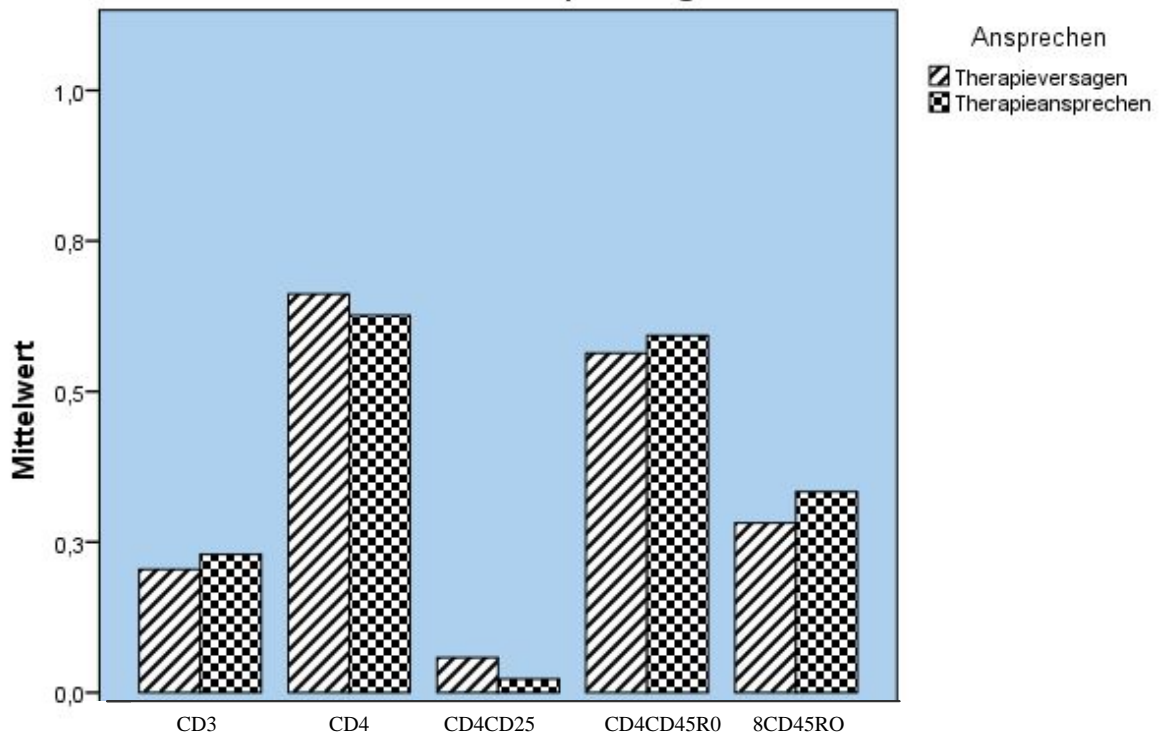
**Abbildung 29: Patienten mit Therapieansprechen zeigten ein weniger ausgeprägtes Exanthem**

*Im Gegensatz zur Mehrzahl der veröffentlichten Studien zeigten Patienten, die auf die Therapie mit Cetuximab mit einer Reduktion des Tumorvolumens („partial remission“) oder einem Stopp des Tumorwachstums („stable disease“) reagierten, in unseren Untersuchungen ein weniger ausgeprägtes Exanthem. Der Unterschied zu den Patienten, die nicht auf eine Cetuximab-Therapie ansprachen, verfehlte mit  $p=0,069$  knapp die statistische Signifikanz.*

#### **4.4.2 Immunbiologische Parameter und das Therapieansprechen**

Die untersuchten Zellpopulationen im Blut und in der Haut der mit Cetuximab behandelten Patienten lassen sich auch in Abhängigkeit vom Therapieansprechen der jeweiligen Patienten darstellen. In Abbildung 30 werden die bei mit Cetuximab behandelten Patienten gegenüber Gesunden und Patienten unter einer Cetuximab-freien Chemotherapie im Blut signifikant veränderten Lymphozytenpopulationen gezeigt, unterteilt in zwei Gruppen in Abhängigkeit vom Therapieerfolg.

### Signifikant veränderte Lymphozytenpopulationen im Blut dargestellt nach dem Therapieerfolg



**Abbildung 30: Bei Therapieansprechen finden sich signifikant weniger regulatorische T-Zellen (CD4+CD25+) im Blut**

Bei Patienten, die auf die Therapie mit Cetuximab ansprechen, finden sich im Blut mit 2,3% signifikant weniger CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen als mit 5,9% ( $p=0,024$ ) bei den Patienten, deren Tumor weiter wächst. Bei den anderen Zellpopulationen findet sich kein Unterschied zwischen den Gruppen.

Bei Patienten, deren Tumor unter der Therapie mit Cetuximab stabil blieb oder sogar schrumpfte, finden sich signifikant weniger regulatorische T-Zellen (CD4+CD25+) als bei Patienten, deren Tumor weiter wuchs ( $p=0,024$ ).

Alle übrigen untersuchten und gegenüber Gesunden und einer Chemotherapie-Gruppe signifikant veränderten Zellpopulationen in Blut und Haut, sowie die antimikrobiellen Peptide in der Haut, waren bei Patienten die auf die Therapie mit Cetuximab ansprachen, und jenen, die nicht darauf ansprachen, nicht signifikant unterschiedlich.

## **5 Diskussion**

Cetuximab wird zunehmend in der Karzinomtherapie eingesetzt. Nebenwirkungen, vor allem Hautreaktionen, sind wohlbekannt. Die Pathogenese des Cetuximab-induzierten Exanthems ist noch nicht geklärt, so dass im Rahmen dieser Untersuchungen die als WoMo-Score quantifizierte Exanthemstärke in Zusammenhang mit immunbiologischen Parametern und mit dem Therapieerfolg beurteilt wurde.

Die vorliegende Arbeit präsentiert Hinweise, dass die durch die Chemotherapie mit oder ohne Cetuximab reduzierten T-Zellen und dendritischen Zellen bei Cetuximab-behandelten Patienten gegenüber Gesunden und Patienten unter einer Standard-Chemotherapie eine veränderte Zusammensetzung aufweisen. Die prozentualen Anteile von T-Helferzellen, regulatorischen T-Zellen und Memory T-Helferzellen an der Gesamtzahl der T-Zellen nehmen zu. Ebenso können sich die prozentualen Anteile der CD11c-CD1a<sup>+</sup> und der CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> myeloiden dendritischen Zellen im Blut an der Gesamtzahl der dendritischen Zellen steigern, während die CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> myeloiden dendritischen Zellen depletiert werden. Die Anzahl der CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> myeloiden dendritischen Zellen im Blut korreliert positiv mit dem Schweregrad des Exanthems, welcher als WoMo-Score quantifiziert wurde.

Unsere Untersuchungen ermöglichten zudem eine nähere Charakterisierung des Cetuximab-induzierten Hautinfiltrats. Im Verlauf der Exanthementstehung wandern dendritische Zellen in die Epidermis ein. Überwiegend handelt es sich dabei um IDEC, wenige Langerhanszellen und vermehrt regulatorischen T-Zellen. Das dermale Infiltrat hingegen besteht maßgeblich aus T-Zellen, wobei die Anzahl der T-Helferzellen in etwa doppelt so hoch ist wie die der zytotoxischen T-Zellen. Weiterhin finden sich Memory T-Zellen und plasmazytoide dendritische Zellen, welche in gesunder Haut nur in geringer Anzahl vorkommen und, im Gegensatz zu den IDEC, auch nicht in der läsionalen Epidermis. Die dermalen zytotoxischen T-Zellen korrelieren negativ sowohl mit der Exanthemstärke bei der Erstvorstellung als auch der maximalen Exanthemausprägung.

Im Gegensatz zur Mehrzahl der veröffentlichten Studien zeigten Patienten, die auf die Therapie mit Cetuximab mit einem Stillstand des Tumorwachstums („stable disease“) oder einer Reduktion des Tumolvolumens („partial remission“) reagierten, in unseren Untersuchungen sogar ein tendenziell geringer ausgeprägtes Exanthem als Patienten mit Tumorprogression. Hingegen zeigten unsere Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen dem Therapieansprechen auf Cetuximab und Abnahme der regulatorischen T-Zellen im Blut dieser Patienten.

### **5.1 Das Cetuximab-assoziierte Exanthem**

In Biopsien des Cetuximab-induzierten Exanthems dominieren neben histologischen Veränderungen, wie einem verdünntem Stratum corneum ohne Korbflecht-artiges Muster und erweiterten Haarfollikelinfundibula, [2] typischerweise neutrophile Granulozyten, T-Zell Subtypen und dendritische Zellen das entzündliche Infiltrat [72]. Aufgrund unserer durchflusszytometrischen und immunohistochemischen Analysen lässt sich das entzündliche Infiltrat der exanthematösen Haut nun näher nach T-Zell-Subtypen und dendritischen Zellen charakterisieren. In unseren Untersuchungen fanden sich in der Epidermis vermehrt regulatorische T-Zellen und IDEC. Das dermale Infiltrat ist maßgeblich durch T-Zellen, T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, Memory T-Zellen und plasmazytoide dendritische Zellen gekennzeichnet.

Tacke et al. haben gezeigt, dass durch eine Entzündung in der Haut dendritische Zellen monozytären Ursprungs in die Haut rekrutiert werden [68], die auf ihrem Weg durch die Hautschichten einem Reifungsprozess zu unterliegen scheinen [20]. So finden sich in unseren Untersuchungen in der entzündlich veränderten Epidermis vermehrt dendritische Zellen, welche im Rahmen der Exanthementstehung einwandern. Überwiegend handelt es sich hierbei um inflammatorische dendritische Zellen (IDEC), welche typischerweise in entzündeter Haut auftreten [76]. Yang et al. [82] konnten zeigen, dass das in unseren immunhistochemischen Färbungen epidermal signifikant erhöhte humane  $\beta$ -Defensin 2 chemotaktisch unreife dendritische Zellen anlockt, was einen Teil des Migrationsmechanismus erklären könnte. Der Anteil der Langerhanszellen an der Gesamtzahl der dendritischen Zellen hingegen vermindert sich, sei es anteilig durch die einwandernden IDEC, sei es, wie

von Eidmo et al. [20] gezeigt werden konnte, dass im Rahmen einer Entzündung die Langerhans-Zellen sehr früh in die Lymphknoten auswandern und erst nach Abheilung wieder durch einwandernde dendritische Zellen ersetzt werden.

Zusätzlich treten in der entzündeten Epidermis des Cetuximab-induzierten Exanthems signifikant mehr regulatorische T-Zellen auf. Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Modulation und vor allem in der Begrenzung immunologischer Reaktionen [44]. Ihre vermehrte Präsenz in der Epidermis kann der Unterdrückung überschießender, insbesondere autoimmunologischer, Prozesse dienen. Die Erhöhung der regulatorischen T-Zellen kann also daher rühren, dass regulatorische T-Zellen die Fähigkeit haben [54] Autoimmunreaktionen, auch bakteriell induzierte, zu hemmen. Ihre vermehrte Präsenz in der Epidermis begünstigt die Eingrenzung der Hautentzündung und verhindert die Entstehung von autoreaktiven T-Zellen.

In unseren immunhistochemischen Untersuchungen setzt sich das dermale Infiltrat vor allem aus T-Zellen, T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen zusammen. Dabei sind etwa doppelt so viele T-Helferzellen wie zytotoxische T-Zellen in den Schnitten der entzündeten Dermis nachweisbar. Eine Zusammensetzung, die sich auch bei makulo-papulösen Arzneimittlexanthemen findet [26].

Busam et al. beschreiben anhand immunhistochemisch erhobenen Daten ein frühes Hautinfiltrat von CD45R0+ T-Zellen um die Haarfollikel [11] in der exanthematösen Haut Cetuximab-behandelter Patienten. In Übereinstimmung mit diesen Beschreibungen finden sich auch in unseren Untersuchungen in der Dermis Cetuximab-behandelter Patienten vermehrt Memory-Zellen (CD45R0+). Zudem werden laut einer Studie von Yang et al. [82] CD45R0+ Memory-Zellen durch das, in unseren Untersuchungen in der Epidermis signifikant erhöhte, humane  $\beta$ -Defensin 2 chemotaktisch angelockt, was zumindest einen Teil der Migrationseffekte erklärt.

Das dermale Infiltrat in unseren Untersuchungen enthält auch plasmazytoide dendritische Zellen, welche in gesunder Haut in sehr geringer Zahl vorkommen [19] und z.B. mit der Rekrutierung weiterer dendritischer Zellen, der antiviralen Immunabwehr [79] und der Entstehung psoriatischer Plaques in Verbindung gebracht werden [83]. Diese plasmazytoiden dendritischen Zellen haben die Fähigkeit in sekundäre lymphatische Organe zu migrieren [49].

## **5.2 Veränderungen von Zellpopulationen im Blut**

Im Blut unserer mit Cetuximab-behandelten Patienten sind die T-Zellen in Folge der Chemotherapie, ebenso wie bei den Patienten unter einer Standard-Chemotherapie vermindert. Während dessen scheinen die T-Helferzellen der Chemotherapie besser zu widerstehen, da sich ihr Anteil an den T-Zellen erhöht.

Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Selbst-Toleranz und der Eingrenzung von Entzündungen [17]. Sie sind bei vielen Malignomen im peripheren Blut und im Tumor erhöht und zeigen einen Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose [11, 16, 22, 28, 30, 31, 34, 44, 47, 48, 51]. So konnten Hong et al. [31] zeigen, dass die Depletion CD4+CD25+ regulatorischer T-Zellen den therapeutischen, anti-tumorösen Effekt einer Natural-Killer-Cell aktivierenden Immuntherapie mit  $\alpha$ -Galaktosylceramid deutlich steigern konnte. Die Entfernung der CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen aus dem Blut führt im Mausmodell zu einer starken Immunreaktion gegen Tumorgewebe, jedoch auch zum Auftreten von Autoimmunkrankheiten wie Autoimmun-Gastritis, Autoimmun-Thyreoiditis und Typ I Diabetes [65].

In unseren Untersuchungen ist im Blut der mit Cetuximab behandelten Patienten der Anteil der regulatorischen T-Zellen an den T-Helferzellen erhöht. Einerseits kann dieser Anstieg auf die Begrenzung autoimmunologischer Reaktionen aufgrund des generalisierten Cetuximab-induzierten Exanthems zurückzuführen sein. Andererseits beschreiben viele Studien [8, 13, 18, 24, 27, 30, 32-34, 36, 46, 49, 50, 53] einen Anstieg und eine gesteigerte Aktivität der regulatorischen T-Zellen bei Tumorpatienten ohne Einfluss einer Cetuximab-Therapie. Dies ist häufig ein Zeichen für eine schlechtere Prognose. Die Erhöhung der regulatorischen T-Zellen kann daher durch die Grunderkrankung bedingt sein. Für diese letzte Möglichkeit spricht auch, dass, wie im Folgenden unter 5.5 dargelegt werden wird, Patienten, die auf eine Therapie mit Cetuximab ansprechen, signifikant weniger regulatorische T-Zellen im Blut haben als Patienten, die nicht auf die Therapie ansprechen.

Neben einer erhöhten Präsenz in der Dermis des Cetuximab-assoziierten Exanthems (s. 5.1.), finden sich auch im Blut Cetuximab-behandelter Patienten vermehrt Memory-Zellen. Nach Yang et al. [82] können diese durch humanes  $\beta$ -Defensin 2



chemotaktisch angelockt werden, die Relevanz für die hier durchgeführten Untersuchung ist jedoch fraglich.

Ferrari et al. [23] beschreiben eine Abnahme der dendritischen Zellen im Blut unter Chemotherapie, mit einer postchemotherapeutischen Dominanz plasmazytoider dendritischer Zellen. In unseren Untersuchungen nehmen bei chemotherapierten Patienten mit oder ohne Cetuximab in Einklang mit den Studien von Ferrari et al. dendritische Zellen (HLRA+Lin-) im Blut insgesamt ab. Wir konnten jedoch unter Cetuximab kein signifikante Zu- oder Abnahme plasmazytoider dendritischer Zellen (BDCA2+ und CD123+) feststellen. In unseren Untersuchungen nahmen CD11-CD1a+ und CD11c+CD1a+ myeloide dendritische Zellen anteilig an der Gesamtzahl der dendritischen Zellen zu, während die CD11c+CD1a- myeloiden dendritischen Zellen depletiert wurden.

Ito et al. [34] konnten zeigen, dass CD11c+CD1a+ myeloide dendritische Zellen aus dem Blut sehr schnell zu Langerhans-Zellen differenzieren können und deren direkte Vorläuferzellen sind. Langerhans-Zellen wandern im Rahmen einer Hautentzündung zur Antigenpräsentation in die Lymphknoten aus und werden in der Epidermis zu einem späteren Zeitpunkt durch einwandernde dendritische Zellen ersetzt [20]. Eine Induktion, und die daraus folgende Vermehrung der Vorläuferzellen der Langerhanszellen im Blut im Rahmen der Hautentzündung, erscheint daher schlüssig.

### **5.3 Expression antimikrobieller Peptide**

In unseren immunhistochemischen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass humanes  $\beta$ -Defensin 2 in der Epidermis bei mit Cetuximab behandelten Patienten signifikant vermehrt exprimiert wird. Humanes  $\beta$ -Defensin 2 weist eine geringere konstitutive Expression und eine größere Varianz in der Expressionslokalisation auf als humanes  $\beta$ -Defensin 1, kann aber durch die Einwirkung von Zytokinen und bakteriellen Antigenen induziert werden [4, 66].

Studien von Yang et al. [82] haben ergeben, dass humanes  $\beta$ -Defensin 2 als chemotaktischer Faktor auf unreife dendritische Zellen und Memory T-Zellen wirkt. Dem widersprechen Soruri et al. [66], die in ihren Studien einen starken

chemotaktischen Effekt von humanem  $\beta$ -Defensin 2 auf Makrophagen und Mastzellen, jedoch nicht auf dendritische Zellen, beschreiben. Im Einklang mit den Studien von Yang et al. [82] finden sich in unseren Untersuchungen vermehrt unreife dendritische Zellen und Memory T-Zellen in der Haut Cetuximab-behandelter Patienten.

Bei den unter Cetuximab beobachteten Hautveränderungen handelt es sich um ein steriles papulo-pustulöses Exanthem [28]. Nur in seltenen Fällen wurden *Propionibacterium acne* und *Staphylococcus aureus* in länger persistenten Läsionen gefunden [22, 72]. Schon seit den Studien von Ricketts et al. 1951 [57] sind hauteigene antimikrobielle Stoffe bekannt, die in der Abwehr von Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielen. Ein Beispiel sind Defensine, die von Säugetieren exprimiert werden. Defensine zeichnen sich durch sechs Cysteinreste aus, die drei intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Psoriatische Läsionen weisen nur selten eine bakterielle Superinfektion auf, was unter anderem auf die Überexpression von humanem  $\beta$ -Defensin 2 zurückgeführt wird [36]. Die fehlende Superinfektion des Cetuximab-induzierten Exanthems könnte auf einem ähnlichen Mechanismus beruhen.

#### **5.4 Korrelation der Veränderungen von Zellpopulationen mit dem Exanthemgrad**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Zellpopulationen einzugrenzen, die den Schweregrad des Exanthems vorhersagen und die Pathogenese erklären helfen. Zu diesem Zweck wurden die bei Cetuximab-behandelten Patienten signifikant veränderten Zellpopulationen mit dem WoMo- und dem WoMax-Score als Maß für die Ausprägung des Cetuximab-induzierten Exanthems korreliert.

In unseren Untersuchungen korreliert der Anteil der CD11c+CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen im Blut positiv mit dem WoMo-Score, die Korrelation mit dem WoMax-Score erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Die CD11c+CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen im Blut sind die direkten Vorläuferzellen der Langerhans-Zellen [34]. Sie können im Rahmen der Hautentzündung induziert

werden um die aus der Epidermis in die Lymphknoten auswandernden Langerhans-Zellen zu ersetzen. Je stärker also die Hautentzündung, umso häufiger treten auch die CD11c+CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen im Blut auf, jedoch ohne Vorhersagewert für die maximale Exanthemausprägung.

Die Anzahl der dermal nachweisbaren zytotoxischen T-Zellen korreliert, allerdings nur schwach, invers sowohl mit dem WoMo- als auch dem WoMax-Score und damit auch invers mit der Schwere des Cetuximab-induzierten Exanthems. Das heißt, je stärker das Exanthem ausgeprägt ist, desto weniger zytotoxische T-Zellen finden sich in der entzündeten Dermis. Dies ist insofern ungewöhnlich, als dass eine vermehrte Präsenz zytotoxischer T-Zellen im Rahmen des klassischen Arzneimittellexanthems mit der schwereren bullösen Form assoziiert ist [26]. Dies ist ein Unterschied zwischen publizierten Daten zum Arzneimittellexanthem und den von uns erhobenen Daten. Sollten sich diese Daten in weiteren Untersuchungen bestätigen, könnte dies als Hinweis auf eine andere Pathogenese des Cetuximab-induzierten Exanthems im Vergleich zum Typ-IV Arzneimittellexanthem aufgefasst werden. Letztendlich bleibt aber die Genese des Cetuximab-induzierten Exanthems weiterhin unklar.

Zusammengefasst haben wir keine Zellpopulation gefunden, die vor Therapiebeginn Aufschluss über die Ausprägung des Cetuximab-induzierten Exanthems gibt.

## **5.5 Das Cetuximab-induzierte Exanthem und das Therapieansprechen**

Nach den Beobachtungen von Cunningham et al. [16], Burtneß et al. [10] und Heidary et al. [28] korreliert unter einer Cetuximab-Therapie das Auftreten des induzierten Exanthems mit der Prognose. Untersuchungen von Bonner et al. [9] sahen bei Kombinationstherapie mit Radiotherapie und Cetuximab einen Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Exanthems und der Überlebensdauer. Dagegen fanden Klinghammer et al. [40] lediglich einen Trend zwischen einem Auftreten des Exanthems und der Überlebensdauer in ihrer Untersuchung eines Docetaxel-basierten Chemotherapie-Regimes kombiniert mit

Cetuximab. Zwischen Überleben und Ausprägung des Exanthems fand sich in ihren Untersuchungen kein Zusammenhang.

In unsere Untersuchungen wurden ausschließlich Patienten mit Cetuximab-induziertem Exanthem eingeschlossen. In unserer Studie ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Cetuximab-induzierten Exanthems und dem Ansprechen des Tumors feststellen. Das Exanthem war in unseren Untersuchungen bei den Patienten, die auf die Therapie mit Cetuximab ansprachen, sogar weniger stark ausgeprägt als bei Patienten ohne Therapieansprechen. Dieser Unterschied zwischen den Patienten mit und jenen ohne Therapieerfolg war jedoch nicht signifikant.

Laux et al. [42] ist es gelungen zu zeigen, dass Dimerisation und Dimerisationspartner des EGF-Rezeptors in der Haut und im Tumorgewebe unterschiedlich verteilt sind und dass der Dimerisationsstatus des EGF-Rezeptors die Hautveränderungen beeinflusst. Auf menschlichen Keratinozyten kommen überwiegend EGF-Rezeptor-Homodimere vor. Die Unterschiede in der Rezeptordimerisation könnten eine fehlende Korrelation zwischen Hautexanthem und Therapieansprechen auf Cetuximab erklären.

Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen zwischen Exanthemausprägung und dem Tumoransprechen in der Literatur [9, 40, 51, 70] sind zwiespältig, stellen jedoch meist keine Korrelation zwischen Exanthemausprägung und dem Therapieansprechen. Zusätzlich wurden die von uns erhobenen Daten an einem besonderen Patientenkollektiv erhoben. Die Patienten aus unserer Cetuximab-Gruppe stellten sich primär aufgrund eines nicht unerheblichen exanthembedingten Leidensdrucks in der Dermatologischen Klinik vor. Da sie nicht direkt auf den onkologischen Stationen rekrutiert wurden, wurden in unsere Untersuchungen nur Patienten mit Cetuximab-bedingtem Exanthem eingeschlossen. Ein systematischer Fehler aufgrund der Rekrutierungsbedingungen kann daher nicht ausgeschlossen werden. Ein Beitrag zum Zusammenhang zwischen Exanthemaufreten und Therapieansprechen kann daher aufgrund des hier erhobenen Datenmaterials nicht geleistet werden.

## **5.6 Immunbiologische Parameter und das Therapieansprechen**

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir zeigen, dass sich im Blut von Patienten, deren Tumor unter der Therapie mit Cetuximab stabil blieb oder sogar schrumpfte, signifikant weniger regulatorische T-Zellen finden als bei Patienten, deren Tumor weiter wuchs.

Viele Studien belegen einen Anstieg und eine gesteigerte Aktivität der regulatorischen T-Zellen bei Krebspatienten unabhängig von einer Cetuximab-Therapie [15, 24, 31, 44, 51, 55, 57, 60, 63, 67, 92, 96, 99, 102]. Dies ist häufig ein Zeichen für eine schlechtere Prognose, was auf eine durch die regulatorischen T-Zellen vermittelte Toleranz zytotoxischer T-Zellen gegenüber den Tumorantigenen zurückgeführt wird [75]. Durch die Depletion regulatorischer T-Zellen konnte im Mausmodell die Anti-Tumor-Aktivität von Natural Killer Cells verstärkt werden [31]. Im Falle kolorektaler Karzinome konnte eine Studie von Salama et al. [60] jedoch einen positiven Zusammenhang zwischen der Infiltration des Tumors mit regulatorischen T-Zellen und dem Überleben feststellen.

Unsere Ergebnisse bestätigen allerdings die vielen Studien, die einen Zusammenhang zwischen vermehrten regulatorischen T-Zellen und einer negativen Prognose des Patienten herstellen konnten.

## **6 Zusammenfassung**

Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper, der zunehmend in der Krebstherapie eingesetzt wird. Die typischste Nebenwirkung ist ein steriles makulo-papulöses Exanthem, das in vielen Studien positiv mit der Prognose korreliert. Auf die Therapie mit Cetuximab spricht jedoch nur ein begrenzter Anteil der Patienten an.

Aufgrund der Nebenwirkungen und der nicht unerheblichen Kosten der Therapie wäre es von Interesse im Vorfeld die Patienten einzugrenzen, die am meisten von der Therapie profitieren. Ein Biomarker, der es erlaubt, vor Beginn der Therapie mit Cetuximab die Wirksamkeit der EGF-Rezeptor Inhibition bei einzelnen Patienten vorherzusagen, war bislang nicht bekannt. Das Exanthem, das in vielen Studien mit der Prognose korreliert, tritt erst einige Tage bis Wochen nach Behandlungsbeginn auf und ist daher als Entscheidungshilfe für oder gegen eine Cetuximab-Therapie ungeeignet. Bei dem Exanthem handelt es sich um eine sterile Entzündung und damit um ein immunologisches Geschehen. So entstand der Ansatz, einen immunologischen Marker zu suchen, der vor Therapiebeginn Aufschluss über die Wirksamkeit von Cetuximab bei unterschiedlichen Patienten geben kann.

Für die vorliegende Arbeit wurden bei Cetuximab-behandelten Patienten Subpopulationen von Lymphozyten und dendritischen Zellen in Blut und Haut und antimikrobielle Peptide in der Haut durchflusszytometrisch und immunhistochemisch untersucht und mit gesunden Kontrollpersonen und Patienten unter einer Standard-Chemotherapie verglichen. Diese immunbiologischen Parameter wurden außerdem auf einen Zusammenhang mit Exanthemstärke und dem Therapieansprechen untersucht.

Im Rahmen unserer Untersuchungen war es uns möglich, das Cetuximab-induzierte Exanthem näher zu charakterisieren. Das Zellinfiltrat wird epidermal durch immigrierte IDEC und regulatorische T-Zellen, dermal durch T-Helferzellen und Memory-Zellen dominiert. Zusätzlich treten plasmazytoide dendritische Zellen auf. Epidermal ist die Expression von humanem  $\beta$ -Defensin 2 erhöht. Der negative Zusammenhang zwischen der Anzahl dermalen zytotoxischer T-Zellen und dem Schweregrad des Exanthems ist ein Hinweis, dass es sich bei der Genese des

Cetuximab-induzierten Exanthems nicht um eine Typ IV Immunreaktion handeln könnte.

Unsere Untersuchungen im Blut haben keine Ergebnisse erbracht, die allein auf die Therapie mit Cetuximab zurückzuführen wären und als Biomarker für die biologische Wirksamkeit des Cetuximab verwendet werden könnten. Manche Veränderungen, wie die Induktion der CD11c+CD1a+ myeloiden dendritischen Zellen im Blut, korrelieren mit der Exanthemausprägung und sind auf das generalisierte Cetuximab-induzierte Exanthem zurückzuführen. Ergebnisse anderer Studien, die eine Zunahme der regulatorischen T-Zellen bei Tumorpatienten als negativen prognostischen Faktor etabliert haben, wurden durch unsere Untersuchungen bestätigt.

In der Mehrzahl der klinischen Studien korreliert das Auftreten des Exanthems positiv mit der Prognose. Die Untersuchungsergebnisse zum Zusammenhang zwischen Exanthemausprägung und der Überlebensdauer sind hingegen zwiespältig. In unsere Studie wurden ausschließlich Patienten mit Cetuximab-induziertem Exanthem eingeschlossen. Die Ausprägung des Exanthems korrelierte in unseren Untersuchungen nicht mit dem Tumoransprechen. Nach neueren Untersuchungen kann eine fehlende Korrelation zwischen Hautexanthem und Therapieansprechen auf Cetuximab mit Unterschieden im Dimerisationsstatus und im Dimerisationspartner des EGF-Rezeptors in der Haut und im Tumorgewebe zusammenhängen. Auf Keratinozyten übernehmen mehrheitlich EGF-Rezeptor Homodimere die Liganden-vermittelte Signalweiterleitung, während diese im Tumorgewebe von anderen EGFR-Heterodimeren vermittelt wird.

Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen zwischen Exanthemausprägung und dem Tumoransprechen in der Literatur stellen jedoch meist keine Korrelation zwischen Exanthemausprägung und dem Therapieansprechen her. Zusätzlich wurden die von uns erhobenen Daten an einem besonderen Patientenkollektiv erhoben. Ein systematischer Fehler aufgrund der Rekrutierungsbedingungen kann nicht ausgeschlossen werden. Ein Zusammenhang zwischen einem Auftreten des Exanthems und dem Therapieansprechen kann daher aufgrund des hier erhobenen Datenmaterials nicht beurteilt werden, da wir nur Patienten mit bestehendem Exanthem in unsere Studie eingeschlossen haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die von uns untersuchten immunologischen Parameter keinen neuen prädiktiven Wert für das Auftreten des Exanthems oder das Ansprechen auf Cetuximab erbracht haben.

In der Literatur ist neben dem negativen K-Ras-Status bisher kein Biomarker beschrieben, der das Ansprechen auf Cetuximab zuverlässig vorhersagen würde.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Abell E (ed) (1997) Inflammatory diseases of the epidermal appendages and of cartilage. Lippincott-Raven, Philadelphia
2. Agero AL, Dusza SW, Benvenuto-Andrade C, Busam KJ, Myskowski P, Halpern AC (2006) Dermatologic side effects associated with the epidermal growth factor receptor inhibitors. *J Am Acad Dermatol* 55:657-670
3. Albanell J, Rojo F, Averbuch S, Feyereislova A, Mascaro JM, Herbst R, LoRusso P, Rischin D, Sauleda S, Gee J, Nicholson RI, Baselga J (2002) Pharmacodynamic studies of the epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839 in skin from cancer patients: histopathologic and molecular consequences of receptor inhibition. *J Clin Oncol* 20:110-124
4. Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG (2001) Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* 117:106-111
5. Alroy I, Yarden Y (1997) The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS letters* 410:83-86
6. Baselga J (2001) The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4:S16-22
7. Baselga J, Norton L, Masui H, Pandiella A, Coplan K, Miller WH, Jr., Mendelsohn J (1993) Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J Nat Canc Inst* 85:1327-1333
8. Baselga J, Trigo, J., Bourhis, J., et al. (2002) Cetuximab (CC25) plus cisplatin/carboplatin is active in patients (pts) with recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) progressing on a same dose and schedule platinum-based regimen (abstract). *Proc Am Soc Clin Oncol* 21
9. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, Raben D, Baselga J, Spencer SA, Zhu J, Youssoufian H, Rowinsky EK, Ang KK Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 11:21-28
10. Burtneß B (2005) The role of cetuximab in the treatment of squamous cell cancer of the head and neck. *Expert Opin Biol Ther* 5:1085-1093
11. Busam KJ, Capodieci P, Motzer R, Kiehn T, Phelan D, Halpern AC (2001) Cutaneous side-effects in cancer patients treated with the antiepidermal growth factor receptor antibody C225. *British J Dermatol* 144:1169-1176

12. Castillo L, Etienne-Grimaldi MC, Fischel JL, Formento P, Magne N, Milano G (2004) Pharmacological background of EGFR targeting. *Ann Oncol* 15:1007-1012
13. Ciardiello F, Bianco R, Damiano V, De Lorenzo S, Pepe S, De Placido S, Fan Z, Mendelsohn J, Bianco AR, Tortora G (1999) Antitumor activity of sequential treatment with topotecan and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225. *Clin Cancer Res* 5:909-916
14. Ciardiello F, Tortora G (2001) A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 7:2958-2970
15. Cohen EE, Rosen F, Stadler WM, Recant W, Stenson K, Huo D, Vokes EE (2003) Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 21:1980-1987
16. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *New Engl J Med* 351:337-345
17. Curiel TJ (2008) Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr Op Immunol* 20:241-246
18. Di Marco E, Pierce JH, Fleming TP, Kraus MH, Molloy CJ, Aaronson SA, Di Fiore PP (1989) Autocrine interaction between TGF alpha and the EGF-receptor: quantitative requirements for induction of the malignant phenotype. *Oncogene* 4:831-838
19. Ebner S, Ehammer Z, Holzmann S, Schwingshackl P, Forstner M, Stoitzner P, Huemer GM, Fritsch P, Romani N (2004) Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int Immunol* 16:877-887
20. Eidsmo L, Allan R, Caminschi I, van Rooijen N, Heath WR, Carbone FR (2009) Differential migration of epidermal and dermal dendritic cells during skin infection. *J Immunol* 182:3165-3172
21. Fan Z, Lu Y, Wu X, Mendelsohn J (1994) Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells. *Journal Biol Chem* 269:27595-27602
22. Fernandez-Galar M, Espana A, Lopez-Picazo JM (2004) Acneiform lesions secondary to ZD1839, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor. *Clin Exp Derm* 29:138-140
23. Ferrari S, Malugani F, Rovati B, Porta C, Riccardi A, Danova M (2005) Flow cytometric analysis of circulating dendritic cell subsets and intracellular cytokine production in advanced breast cancer patients. *Oncol Rep* 14:113-120
24. Folprecht G, Lutz MP, Schoffski P, Seufferlein T, Nolting A, Pollert P, Kohne CH (2006) Cetuximab and irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid is a safe combination for

the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal carcinoma. *Ann Oncol* 17:450-456

25. Gill GN, Kawamoto T, Cochet C, Le A, Sato JD, Masui H, McLeod C, Mendelsohn J (1984) Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem* 259:7755-7760
26. Hari Y, Frutig-Schnyder K, Hurni M, Yawalkar N, Zanni MP, Schnyder B, Kappeler A, von Greysz S, Braathen LR, Pichler WJ (2001) T cell involvement in cutaneous drug eruptions. *Clin Exp Allergy* 31:1398-1408
27. Harris M (2004) Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol* 5:292-302
28. Heidary N, Naik H, Burgin S (2008) Chemotherapeutic agents and the skin: An update. *J Am Acad Dermatol* 58:545-570
29. Herbst RS, Hong WK (2002) IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for treatment of head and neck cancer. *Semin Oncol* 29:18-30
30. Higashiyama S, Iwabuki H, Morimoto C, Hieda M, Inoue H, Matsushita N (2008) Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Scie* 99:214-220
31. Hong H, Gu Y, Zhang H, Simon AK, Chen X, Wu C, Xu XN, Jiang S Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells enhances natural killer T cell-mediated anti-tumour immunity in a murine mammary breast cancer model. *Clin Exp Immunol* 159:93-99
32. Hu JC, Sadeghi P, Pinter-Brown LC, Yashar S, Chiu MW (2007) Cutaneous side effects of epidermal growth factor receptor inhibitors: clinical presentation, pathogenesis, and management. *J Am Acad Dermatol* 56:317-326
33. Huang SM, Harari PM (2000) Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 6:2166-2174
34. Ito T, Inaba M, Inaba K, Toki J, Sogo S, Iguchi T, Adachi Y, Yamaguchi K, Amakawa R, Valladeau J, Saeland S, Fukuhara S, Ikehara S (1999) A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol* 163:1409-1419
35. Jacot W, Bessis D, Jorda E, Ychou M, Fabbro M, Pujol JL, Guillot B (2004) Acneiform eruption induced by epidermal growth factor receptor inhibitors in patients with solid tumours. *British J Dermatol* 151:238-241
36. Jansen PA, Rodijk-Olthuis D, Hollox EJ, Kamsteeg M, Tjabringa GS, de Jongh GJ, van Vlijmen-Willems IM, Bergboer JG, van Rossum MM, de Jong EM, den Heijer M, Evers AW, Bergers M, Armour JA, Zeeuwen PL, Schalkwijk J (2009) Beta-defensin-2

protein is a serum biomarker for disease activity in psoriasis and reaches biologically relevant concentrations in lesional skin. *PLoS one* 4:e4725

37. Kawamoto T, Sato JD, Le A, Polikoff J, Sato GH, Mendelsohn J (1983) Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1337-1341
38. Kies M, Arquette M, Nabell L, et al. (2002) Final report of the efficacy and safety of the anti-epidermal growth factor antibody Erbitux (IMC-225) in combination with cisplatin in patients with recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) refractory to cisplatin containing chemotherapy. *Proc Am Soc Clin Oncol* 21
39. Kiyota A, Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, Ueyama Y, Matsumura T, Tachikawa T, Wong DT (2002) Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 upregulates p27(KIP1) and p15(INK4B) and induces G1 arrest in oral squamous carcinoma cell lines. *Oncology* 63:92-98
40. Klinghammer K, Knodler M, Schmittel A, Budach V, Keilholz U, Tinhofer I Association of epidermal growth factor receptor polymorphism, skin toxicity, and outcome in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. *Clin Cancer Res* 16:304-310
41. Lacroix H, Iglehart JD, Skinner MA, Kraus MH (1989) Overexpression of erbB-2 or EGF receptor proteins present in early stage mammary carcinoma is detected simultaneously in matched primary tumors and regional metastases. *Oncogene* 4:145-151
42. Laux I, Jain A, Singh S, Agus DB (2006) Epidermal growth factor receptor dimerization status determines skin toxicity to HER-kinase targeted therapies. *Brit J Cancer* 94:85-92
43. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM (2005) Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer cell* 7:301-311
44. Loser K, Beissert S (2007) Dendritic cells and T cells in the regulation of cutaneous immunity. *Adv Dermatol* 23:307-333
45. Masui H, Borman B, Hyman J, et al. (1991) Treatment with anti EGF receptor monoclonal antibody causes regression of DiFi human colorectal carcinoma xenografts. *Proc Am Soc Clin Cancer Res* 32
46. Molinari E, De Quatrebarbes J, Andre T, Aractingi S (2005) Cetuximab-induced acne. *Dermatology (Basel, Switzerland)* 211:330-333
47. Pastore S, Mascia F, Mariani V, Girolomoni G (2008) The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *Journal Invest Dermatol* 128:1365-1374

48. Peng D, Fan Z, Lu Y, DeBlasio T, Scher H, Mendelsohn J (1996) Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. *Cancer Res* 56:3666-3669
49. Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L (2002) Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 63:1164-1171
50. Perez-Soler R, Chachoua A, Hammond LA, Rowinsky EK, Huberman M, Karp D, Rigas J, Clark GM, Santabarbara P, Bonomi P (2004) Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non--small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 22:3238-3247
51. Perez-Soler R, Saltz L (2005) Cutaneous adverse effects with HER1/EGFR-targeted agents: is there a silver lining? *J Clin Oncol* 23:5235-5246
52. Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, Radinsky R, Dinney CP (1999) Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 5:257-265
53. Pittelkow MR, Cook PW, Shipley GD, Derynck R, Coffey RJ, Jr. (1993) Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy. *Cell Growth Differ* 4:513-521
54. Raghavan S, Holmgren J (2005) CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. *FEMS Immunol Medical Microbiol* 44:121-127
55. Ramirez BS, Alpizar YA, Fernandez DR, Hidalgo GG, Capote AR, Rodriguez RP, Fernandez LE (2008) Anti-EGFR activation, anti-proliferative and pro-apoptotic effects of polyclonal antibodies induced by EGFR-based cancer vaccine. *Vaccine* 26:4918-4926
56. Reiter JL, Maihle NJ (1996) A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. *Nucleic acids Res* 24:4050-4056
57. Ricketts C SJ, Topley E (1951) Human skin lipids with particular reference to the self-sterilizing power of the skin. *Clin Sci*:89-96
58. Robert C, Soria JC, Spatz A, Le Cesne A, Malka D, Pautier P, Wechsler J, Lhomme C, Escudier B, Boige V, Armand JP, Le Chevalier T (2005) Cutaneous side-effects of kinase inhibitors and blocking antibodies. *Lancet Oncol* 6:491-500
59. Roskos L. LM, Osborn K., Pasumarthi R., Lu H., Funelas C., et al. (2002) Low pharmacokinetic variability facilitates optimal dosing of ABX-EGF in cancer patients (abstract 362). *Proc Am Soc Clin Oncol* 21
60. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, Platell C, Iacopetta B (2009) Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27:186-192

61. Saltz LB, Kies M.S., Abbruzzese J.L., Azarnia N., Needle M. (2003) The presence and intensity of the cetuximab-induced acne-like rash predicts increased survival in studies across multiple malignancies (abstract 817). *Proc Am Soc Clin Oncol* 22
62. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Sr., Needle MN, Kopit J, Mayer RJ (2004) Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 22:1201-1208
63. Saltz LB, Rubin, M.S., Hochster, H. (2001) Acne-like rash predicts response in patients treated with Cetuximab (IMC-225) plus Irinotecan (CPT-11) in CPT-11-refractory colorectal cancer (CRC) that expresses epidermal growth factor receptor (EGFR). *ASCO May 31<sup>st</sup> – June 3<sup>rd</sup> 2003, Abstract #817*
64. Schneider MR, Werner S, Paus R, Wolf E (2008) Beyond wavy hairs: the epidermal growth factor receptor and its ligands in skin biology and pathology. *Am J Pathol* 173:14-24
65. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S (1999) Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163:5211-5218
66. Soruri A, Grigat J, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J (2007) beta-Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. *Europ Journal Immunol* 37:2474-2486
67. Soulieres D, Senzer NN, Vokes EE, Hidalgo M, Agarwala SS, Siu LL (2004) Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *J Clin Oncol* 22:77-85
68. Tacke F, Ginhoux F, Jakubzick C, van Rooijen N, Merad M, Randolph GJ (2006) Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J Exp Med* 203:583-597
69. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG (2000) New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 92:205-216
70. Tomkova H, Kohoutek M, Zabojsnikova M, Pospiskova M, Ostrizkova L, Gharibyar M Cetuximab-induced cutaneous toxicity. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 24:692-696
71. Van de Vijver MJ, Kumar R, Mendelsohn J (1991) Ligand-induced activation of A431 cell epidermal growth factor receptors occurs primarily by an autocrine pathway that acts upon receptors on the surface rather than intracellularly. *J Biol Chem* 266:7503-7508
72. Van Doorn R, Kirtschig G, Scheffer E, Stoof TJ, Giaccone G (2002) Follicular and epidermal alterations in patients treated with ZD1839 (Iressa), an inhibitor of the epidermal growth factor receptor. *Brit J Dermatol* 147:598-601

73. Veale D, Kerr N, Gibson GJ, Kelly PJ, Harris AL (1993) The relationship of quantitative epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer to long term survival. *Brit J Cancer* 68:162-165
74. Vincenzi B, Schiavon G, Silletta M, Santini D, Tonini G (2008) The biological properties of cetuximab. *Crit Rev Oncol Hematol* 68:93-106
75. Whiteside TL Immune responses to malignancies. *J Allergy Clin Immunol* 125:S272-283
76. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T (1996) Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 106:446-453
77. Wollenberg A, Moosmann N, Klein E, Katzer K (2008) A tool for scoring of acneiform skin eruptions induced by EGF receptor inhibition. *Exp Dermatol* 17:790-792
78. Wollenberg A, Moosmann N, Kroth J, Heinemann V, Klein E (2007) [Therapy of severe cetuximab-induced acneiform eruptions with oral retinoid, topical antibiotic and topical corticosteroid]. *Hautarzt* 58:615-618
79. Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M, Rothenfusser S, Wetzel S, Endres S, Hartmann G (2002) Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 119:1096-1102
80. Woodburn JR (1999) The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 82:241-250
81. Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J (1995) Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J Clin Invest* 95:1897-1905
82. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schroder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science (New York, NY)* 286:525-528
83. Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA (2009) Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol* 129:302-308

## Anhang

### 8.1 Statistisch nicht signifikant veränderte Zellpopulationen

#### 8.1.1 Zellpopulationen im Blut

Im Folgenden werden die Daten aller weiteren untersuchten und nicht unter 3.1 genannten Zellpopulationen im Blut der Cetuximab-Patienten (s. Tabelle 9 und 10) gezeigt, die sich nicht signifikant von den Kontrollpopulationen unterschieden haben. Die Mittelwerte und Standardabweichung der Lymphozytenpopulationen sind in Tabelle 9 dargestellt und beziehen sich auf die 7AAD- lebenden Zellen.

Antigene	Gruppenvergleich für 3 unabhängige Stichproben	Mittelwerte		
		Cetuximab	Gesund	Chemo
CD3-CD56+	n.s.	2,7% ± 2,4%	3,1% ± 3,0%	2,25% ± 1,7%
CD3+CD56+	n.s.	0,5% ± 0,06%	0,5% ± 0,4%	0,3% ± 0,3%
CD3+CD69+	n.s.	0,1% ± 0,3%	0,2% ± 0,2%	0,1% ± 0,1%
CD8+CD25+	n.s.	1,5% ± 0,4%	0,3% ± 0,4%	0,4% ± 0,5%
CD8+	n.s.	24,5% ± 13,5%	33,1% ± 8,5%	28,075% ± 13,9%

**Tabelle 9: Durchflusszytometrische Analyse von Lymphozytenpopulationen im Blut unter Cetuximab, Chemotherapie und bei Gesunden**

*Die Prozentzahlen beziehen sich für die CD56+CD3- NK-Zellen, für die CD56+CD3+ NKT-Zellen und die CD69+CD3+ aktivierten T-Zellen auf die 7AAD- lebenden Zellen; für die CD25+CD8+ nicht-regulatorischen Memory T-Zellen auf die CD8+ zytotoxischen T-Zellen und für die CD8+ zytotoxischen T-Zellen auf die CD3+ T-Zellen.*

Die Mittelwerte und Standardabweichung der statistisch nicht signifikant veränderten Populationen dendritischer Zellen im Blut sind in Tabelle 10 dargestellt.

Antigene	Gruppenvergleich für 3 unabhängige Stichproben	Mittelwerte und Standardabweichung		
		Cetuximab	Gesund	Chemo
CD11c-BDCA2+	n.s.	23,4% ± 16,2%	17,7% ± 15,9%	22,2% ± 15,0%
CD11c-CD123+	n.s.	25,6% ± 15,2%	20,0% ± 10,5%	24% ± 18,7%
CD11c+BDCA2-	n.s.	29,0% ± 17,6%	37,6% ± 14,1%	38,3% ± 15,4
CD11c+CD123-	n.s.	30,2% ± 16,6%	37,6% ± 13,0%	39,5% ± 15,4

**Tabelle 10: Durchflusszytometrischen Analyse von Populationen dendritischer Zellen im Blut unter Cetuximab, Chemotherapie und bei Gesunden.**

*Die Prozentangaben beziehen sich auf die HLADR+Lin- dendritischen Zellen.*



### 8.1.2 Zellpopulationen und antimikrobielle Peptide in der Haut

Alle übrigen untersuchten und unter 3.2 nicht genannten in der Spalthaut durchflusszytometrisch und in der Vollhaut immunhistochemisch untersuchten Merkmale zeigten bei mit Cetuximab behandelten Patienten sowohl im Vergleich zur Chemotherapie-Kontrollgruppe als auch im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zwar deutliche Unterschiede, diese waren jedoch nicht signifikant.

Mittelwerte und Standardabweichung dieser Zellpopulationen aus der Spalthaut sind in Tabelle 11 dargestellt.

Antigene	Signifikanz	Mittelwerte und Standardabweichung	
	Cetuximab/Gesund	Cetuximab	Gesund
C11c+CD1a-	n.s.	5,7% ± 7,1%	1,6% ± 1,7
CD11c+CD1a+	n.s.	2,1% ± 3,1%	1,1% ± 1,6%
CD11c-BDCA2+	n.s.	4,0% ± 6,2%	2,1% ± 3,3%
CD11c-CD123+	n.s.	2,3% ± 3,2%	0,5% ± 1,0%
CD11c+BDCA2-	n.s.	6,4% ± 7,0%	2,5% ± 3,6%
CD11c+CD123-	n.s.	6,8% ± 7,0%	2,3% ± 1,8%

**Tabelle 11: Durchflusszytometrische Analyse von Populationen dendritischer Zellen in der Spalthaut unter Cetuximab und bei Gesunden**

*Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtzellen aller HLADR+Lin- dendritischen Zellen.*

In Tabelle 12 sind die statistisch nicht signifikant veränderten Immunzellpopulationen und antimikrobiellen Peptide in der Epidermis zusammengefasst.

Epidermal Antigene	Signifikanz	Mittelwerte und Standardabweichung	
	Cetuximab/Gesund	Cetuximab	Gesund
CD3+	n.s.	5,6 ± 4,3	2,9 ± 4,0
CD4+	n.s.	2,6 ± 5,3	0,3 ± 0,4
CD8+	n.s.	1,8 ± 1,7	0,5 ± 0,8
CD45R0	n.s.	0,8 ± 2,1	0,1 ± 0,3
CD45RA	n.s.	07 ± 0,9	2,2 ± 3,2
CD56	n.s.	0,5 ± 1,6	0,1 ± 0,1
CD68	n.s.	0,2 ± 0,5	0,1 ± 0,1
CD207	n.s.	5,4 ± 10,0	6,3 ± 2,2
BDCA2	n.s.	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0
HBD1	n.s.	1,8 ± 0,8	1,3 ± 0,1
HBD3	n.s.	0,2 ± 0,3	0,0 ± 0,0
Cathelicidin	n.s.	0,8 ± 0,8	0,2 ± 0,4

**Tabelle 12: Immunhistochemische Analyse von Populationen von Lymphozyten, dendritischen Zellen und antimikrobiellen Peptiden in der Epidermis unter Cetuximab und bei Gesunden**

*Für jedes Antigen wurden in 3 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern die angefärbten Zellen ausgezählt und gemittelt.*

In Tabelle 13 sind die statistisch nicht signifikant veränderten Immunzellpopulationen und antimikrobiellen Peptide in der Dermis zusammengefasst.

<b>Dermal Antigene</b>	<b>Signifikanz</b>	<b>Mittelwerte und Standardabweichung</b>	
	<b>Cetuximab/Gesund</b>	<b>Cetuximab</b>	<b>Gesund</b>
CD25+	n.s.	12,9 ± 8,0	5,3 ± 6,2
CD45RA	n.s.	7,6 ± 5,1	4,0 ± 2,8
CD56	n.s.	6,1 ± 4,3	2,4 ± 3,8
CD68	n.s.	24,1 ± 15,7	13,7 ± 17,8
CD206	n.s.	30,7 ± 12,6	7,2 ± 7,4
CD207	n.s.	1,6 ± 7,1	0,1 ± 0,3
HBD1	n.s.	0,6 ± 1,5	0,1 ± 0,1
HBD2	n.s.	0,3 ± 0,3	0,0 ± 0,0
HBD3	n.s.	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Cathelicidin	n.s.	6,1 ± 5,2	2,7 ± 6,0

**Tabelle 13: Immunohistochemische Analyse von Populationen von Lymphozyten und dendritischen Zellen in der Dermis unter Cetuximab und bei Gesunden**

*Für jedes Antigen wurden in 3 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern die angefärbten Zellen ausgezählt und gemittelt.*

Diese in der Vollhaut immunhistochemisch untersuchten Merkmale waren bei mit Cetuximab-behandelten Patienten im Vergleich zur Chemotherapie-Kontrollgruppe und zu gesunden Kontrollpersonen statistisch unverändert.

### **8.3 Reagenzien für die Durchflusszytometrie**

#### **8.2.1 Puffer**

*Waschmedium:* RPMI 1640 Medium

*Kulturmedium:* RPMI 1640 Medium +10ml Antibiotikum/Antimykotikum + 20ml FKS

*Facs-Puffer:* 0,5l unsteriles PBS + 5ml 10% Na-Azid Lösung

*Formalin-Puffer:* Facs-Puffer + 2% Formalin

*Saponinpuffer:* Facs-Puffer + 0,5% Saponin

### 8.2.2 Antikörperverdünnung

In Tabelle 14 sind die verwendeten Antikörper mit ihren Verdünnungen zusammengefasst (Hersteller: siehe Material und Methoden, 3.2 Material)

Antikörper	Verdünnung für 50 $\mu$ l
CD1a-PE	1:75
CD3-FITC	1:50
CD4-PE-Cy7	1:250
CD8-APC-Cy7	1:50
CD11c-APC	1:25
CD25FITC	1:250
CD45RO-APC	1:25
CD56-Alexa647	1:50
CD69-PE	1:25
CD123-PE	1:25
BDCA-2-PE	1:25
HLA-DR-PE-Cy7	1:150
LIN-FITC	1:50
7AAD	Stock:1:1000 VV 1:50
IFN $\gamma$ -PE	1:25
IL4-PE	1:25
Kontrolle APC	1:100
Kontrolle PE-Cy7	1:200
Alle anderen Kontrollen extrazellulär	1:50
Alle Kontrollen intrazellulär	1:25

Tabelle 14: Verwendete Antikörper und Verdünnungen

### 8.3 Reagenzien für die Immunhistochemie

*Tris-Puffer Stammlösung:*

60,55g Trisma Base + 87,66g NaCl mit Aqua bidest. auf 900ml auffüllen, dann mit 25% Salzsäure auf ph 7,4 titrieren und auf 1000ml auffüllen, falls zu sauer mit NaOH auf ph 7,4 titrieren

*Tris-Gebrauchspuffer:*

Tris-Stammlösung 1:10 mit Aqua bidest verdünnen und 0,5ml Tween zugeben, danach gut schütteln.

*Milch:*

0,1 g Milchpuffer (Laktose) mit 100 ml Tris-Puffer auffüllen

*Dewax-Lösung:*

300ml EZ-DeWax Concentrate mit Ethanol ansetzen

*Citrat-Puffer:*

2,1 Citric acid in 500 ml Aqua bidest. lösen, mit NaOH auf pH 3,0 (um 30 min zu inkubieren), bzw. 6,0 (um 10 min zu kochen) auftitrieren, je nach Methode

## **8     Danksagung**

Mein Dank gilt allen, die diese Arbeit ermöglicht und mir in der Zeit der Promotion ihre Unterstützung gewährt haben.

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Thomas Ruzicka, Direktor der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Bereitstellung der Labore und der Arbeitsmöglichkeiten.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Andreas Wollenberg, möchte ich für die Überlassung der Themas danken. Das konstruktive Feedback in allen Stadien der vorliegenden Arbeit und die intensive persönliche Betreuung insbesondere während der Ausarbeitung der finalen Fassung verdienen meinen besonderen Dank.

Ich danke meiner Betreuerin Frau Dr. med. Julia Tietze für die Einweisung in die Methodik der Durchflusszytometrie und das Erstellen der Färbeprotokolle.

Für die dermatologische Betreuung und Beurteilung der Patienten, sowie die Entnahme der Blut- und Hautproben, möchte ich Frau Dr. med. Kerstin Katzer, meiner Betreuerin Frau Dr. med. Julia Tietze und meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Andreas Wollenberg danken.

Ich möchte den behandelnden Onkologen für die Entnahme der Blutproben, die klinische Beurteilung der Patienten und die Bereitstellung der Daten zum Therapieansprechen aus ihrer Datenbank meinen Dank aussprechen. Insbesondere erwähnt seien hier Herr Professor Dr. med. Volker Heinemann, Herr Professor Dr. med. Christoph Salat, Frau Dr. Sandra Geiger, Frau Dr. med. Dorit Lässig, Herr Dr. med. Nicolas Moosmann und Frau Sabine Kaiser.

Nicht unerwähnt bleiben soll die methodische Unterstützung bei der Färbung der immunhistochemischen Schnitte durch die Medizinisch-Technischen Assistentinnen des Labors für Immunhistochemie, sowie die logistische Unterstützung, wofür ich ihnen danken möchte. Ebenso dankbar bin ich für die Paraffinierung der histologischen Schnitte durch die Mitarbeiter des Labors für Histologie unter der Leitung von Dr. med. Michael Flaig und die Überlassung von Hautproben für Kontrollfärbungen.

Insbesondere möchte ich meinen Eltern und meiner Familie für ihre Hilfe danken. Hier sind vor allem die moralische Unterstützung durch meine Mutter Frau Dr. med. Elisabeth Cyran und die inspirierenden Ideen und Vorschläge meines Vaters Herr Professor Dr. med. Joachim Cyran hervorzuheben.

## 9 Lebenslauf

Vornamen und Nachname: Carolin Anna Maria Cyran

Geboren am 12. April 1984 in München

### Facharztausbildung

Seit Oktober 2009 Facharztausbildung an der Neurologischen Klinik  
und Poliklinik der LMU München

### Studium

Mai 2009 Medizinisches Staatsexamen an der LMU München  
März 2005 Physikum an der LMU München  
ab Oktober 2002 Studium an der medizinischen Fakultät der LMU München

### Praktisches Jahr

Oktober 2008 – Januar 2009 Medizinischen Klinik I und III im Klinikum  
Großhadern der LMU München  
August – Oktober 2008 Chirurgischen Klinik und Poliklinik Innenstadt der  
LMU München  
Juni - August 2008 Servicio de Cirugía Plástica y estética de adultos  
im Hospital italiano de Buenos Aires, Argentinien  
Februar 2008 Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der LMU München

### Schulbildung

1999 –2002 Collège Champittet in Lausanne, Schweiz, und  
Schweizer Eidgenössische Maturität (Typ D  
Moderne Sprachen, Abschluss mit 85 von 90  
Punkten)  
1998 –1999 Robert-Mayer-Gymnasiums in Heilbronn  
1997 –1998 Princess-Helena-College in Preston, England  
1994-1997 Robert-Mayer-Gymnasium in Heilbronn  
1990-1994 Gerhardt-Hauptmann-Schule in Heilbronn

München, den 22.Oktober 2010

Carolin Cyran